

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINES
TRIFUNKTIONELLEN β -OXIDATIONSENZYMS
AUS NEUROSPORA CRASSA

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
an der Ruhr - Universität Bochum

vorgelegt von

Apotheker
ROLF THIERINGER
aus Recklinghausen

Bochum 1987

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINES
TRIFUNKTIONELLEN β - OXIDATIONSENZYMS
AUS NEUROSPORA CRASSA

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
an der Ruhr - Universität Bochum

vorgelegt von

Apotheker
ROLF THIERINGER
aus Recklinghausen

Bochum 1987

Ein Teil der vorliegenden Arbeit wurde 1987 unter dem Titel:

" β -Oxidation Systems in Eukaryotic Microorganisms" in: Peroxisomes in Biology and Medicine, ed. H.D. Fahimi, H. Sies, Springer-Verlag, 128 - 140, veröffentlicht.

Weitere Teile wurden auf folgenden Kongressen vorgestellt:

IUB - IUPAB Bioenergetics Groups, Third European Bioenergetics Conference, Hannover (1984)

"Glyoxysomal fatty acid degradation in *Neurospora crassa*" (Kionka, C., Thieringer, R. and Kunau, W.-H.; Abstr. p.489)

FEBS-Meeting, Algarve/Portugal (1985)

"A glyoxysomal β -oxidation system in *Neurospora crassa*" (Kionka, C., Thieringer, R., de la Garza, M. and Kunau, W.-H.; Abstr. p.136)

UNESCO - IUB Workshop Zeist (1985)

"Comparison of β -oxidation enzymes from *Candida tropicalis* and *Neurospora crassa*"

(Thieringer, R., Kionka, C., Schultz-Borchard, U. and Kunau, W.-H.; Abstr. II - 3)

International Symposium on Peroxisomes in Biology and Medicine, Heidelberg (1986)

"Structural characterization of the trifunctional β -oxidation protein from *Neurospora crassa*"

(Thieringer, R. and Kunau, W.-H.; Eur. J. Cell Biol. 41, Suppl. 14, p.41)

"In vitro translation of mRNA coding for catalase and β -oxidation proteins in *Neurospora crassa*"

(Kionka, C., Thieringer, R. and Kunau, W.-H.; Eur. J. Cell Biol. 41, Suppl. 14, p.23).

	<u>Seite</u>
<u>INHALTSVERZEICHNIS</u>	
1.	Einleitung 1
2.	Material und Methoden 13
2.1	Chemikalien und Radiochemikalien 13
2.2	Mikroorganismus 14
2.3	Versuchstiere 14
2.4	Antiseren 14
2.5	Kultur von <i>Neurospora crassa</i> 14
2.6	Zellaufschluß 16
2.6.1	Aufschlußmedien 16
2.6.2	Zellaufschluß durch Mörsern 17
2.6.3	Zellaufschluß mit dem Bead-Beater 17
2.7	Saccharosedichtegradientenzentrifugation 18
2.8	Aufschluß von Glyoxysomen durch osmotischen Schock 18
2.9	Säulenchromatographie 19
2.9.1	Kationenaustauschromatographie an Phosphocellulose P-11 19
2.9.2	"Dye-ligand"-Chromatographie an Blue Sepharose CL-6B 20
2.9.3	"Dye-ligand"-Chromatographie an Matrex Gel Red A 20
2.9.4	Affinitätschromatographie an NAD-Agarose (Type 1) 21
2.9.5	Adsorptionschromatographie an Ultrogel HA (Hydroxylapatit) 21
2.9.6	Gelchromatographie an Sephacryl S-300 Superfine 22
2.10	Polyacrylamidgelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (SDS-PAGE) 22
2.11	Fluorographie 24

	<u>Seite</u>
2.12 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrocellu- lose (Western Blotting)	24
2.13 Elektroelution mit nachfolgender Elektrodialyse	25
2.14 Zweidimensionale Gelelektrophorese	27
2.14.1 IEF/SDS-PAGE	27
2.14.2 Nonequilibrium-pH-Gradientenelektrophorese (NEPHGE)	28
2.15 Limitierte Proteolyse	29
2.15.1 Limitierte Proteolyse von nativen Proteinproben	29
2.15.2 Limitierte Proteolyse von denaturiertem Protein	30
2.15.3 Limitierte Proteolyse von Fragmenten aus Tryp- sinverdauung nach Cleveland	30
2.16 Immunologische Methoden	31
2.16.1 Gewinnung von Antiseren	31
2.16.1.1 Gewinnung von Antiseren durch Immunisierung mit Proteinlösungen	31
2.16.1.2 Gewinnung von Antiseren durch Immunisierung mit denaturierten Proben nach SDS-PAGE	32
2.16.2 Doppeldiffusionsanalyse nach Ouchterlony	32
2.16.3 Immunelektrophorese nach Grabar und Williams	33
2.16.4 Immuntitration	33
2.16.4.1 Immuntitration durch direkte Immunpräzipitation	33
2.16.4.2 Immuntitration nach Sewell	34
2.16.5 Indirekte Immunpräzipitation	35
2.16.6 ELISA nach Western Blotting (Immunblotting)	36
2.16.7 Affinitätsreinigung von Antikörpern aus hete- rogenen Proben	36
2.17 Isolierung und Reinigung von mRNA	37
2.17.1 Isolierung von total-RNA	37
2.17.2 Cäsiumchlorid-Gradientenzentrifugation	38

	<u>Seite</u>
2.17.3 Isolierung von poly A-RNA durch Chromatographie an Oligo-dT-Cellulose	38
2.17.4 Gehaltsbestimmung und Qualitätskontrolle der RNA	39
2.18 In vitro Translation	39
2.19 pH-Messungen	40
2.20 Leitfähigkeitsmessungen	40
2.21 Proteinbestimmungen	40
2.22 Enzymbestimmungen	40
2.23 Aminosäureanalysen	42
2.23.1 Bestimmung der Aminosäurekomposition	42
2.23.2 Aminoterminal Sequenzanalyse	44
3. Ergebnisse	45
3.1 Wachstum und Induktion der β -Oxidation von <i>Neurospora crassa</i>	45
3.2 Proteinreinigungen	47
3.2.1 Kationenaustauschchromatographie eines Rohextraktes an Phosphocellulose P-11	49
3.2.2 Reinigung des Trifunktionellen Enzyms	51
3.2.2.1 Trennung der 3-cis,2-trans-Enoyl-CoA Isomerase vom Trifunktionellen Enzym durch "dye-ligand"-Chromatographie an Blue Sepharose CL-6B	51
3.2.2.2 Adsorption an Hydroxylapatit	53
3.2.2.3 Zusammenfassung der Reinigung des Trifunktionellen Enzyms	54
3.2.2.4 Bindung des Trifunktionellen Enzyms an NAD-Agarose	58
3.2.3 Partielle Reinigung der 3-cis,2-trans-Enoyl-CoA Isomerase	59
3.2.3.1 Bindung der Isomerase an Hydroxylapatit	59
3.2.3.2 Zusammenfassung der Schritte zur partiellen Reinigung der 3-cis,2-trans-Enoyl-CoA Isomerase	61
3.2.4 Reinigung der mitochondrialen Enoyl-CoA Hydratase	64

	<u>Seite</u>
3.2.4.1	Adsorptionschromatographie an Hydroxylapatit 64
3.2.4.2	Bindung an Blue Sepharose CL-6B 65
3.2.4.3	Bindung an Matrex Gel Red A 67
3.2.4.4	Zusammenfassung der Reinigung der mitochondrialen Enoyl-CoA Hydratase 68
3.3	Molekulare Charakterisierung der mitochondrialen Enoyl-CoA Hydratase und des Trifunktionellen Enzyms 71
3.3.1	Bestimmung der Molekulargewichte der Untereinheiten 71
3.3.2	Bestimmung der Molekulargewichte der nativen Enzyme 73
3.3.3	Vergleich der Hitzestabilität 75
3.3.4	Vergleich der pH-Optima der Enoyl-CoA Hydrataseaktivitäten 76
3.3.5	Ermittlung der Michaelis-Konstanten 77
3.3.6	Substratspezifität der Enoyl-CoA Hydrataseaktivitäten 78
3.3.7	Zweidimensionale Gelelektrophoresen des Trifunktionellen Enzyms 79
3.4	Immunologische Charakterisierungen 82
3.4.1	Immunologische Charakterisierung der mitochondrialen Enoyl-CoA Hydratase 82
3.4.1.1	Gewinnung von Antiserum 82
3.4.1.2	Überprüfung der Spezifität des Antiserums im Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony 82
3.4.1.3	Überprüfung der Spezifität des Antiserums durch Immunoblotting 83
3.4.1.4	Bestimmung des Antiserumtiters durch Sewell-Titration 84
3.4.1.5	Bestimmung der mitochondrialen Enoyl-CoA Hydrataseaktivität nach Immuntitration 86
3.4.2	Immunologische Charakterisierung des Trifunktionellen Enzyms 87
3.4.2.1	Gewinnung von Antiserum gegen natives Trifunktionelles Enzym 87

	<u>Seite</u>
3.4.2.2	Oberprüfung der Spezifität des Antiserums im Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony 87
3.4.2.3	Überprüfung der Spezifität des Antiserums durch Immunoblotting 90
3.4.2.4	Immunelektrophorese des Trifunktionellen Enzyms 91
3.4.2.5	Bestimmung des Antiserumtiters durch Sewell- Titration 91
3.4.2.6	Bestimmung der Enzymaktivitäten des Trifunk- tionellen Enzyms nach Immuntitration 92
3.4.2.7	Immunologische Kreuzreaktionen des Trifunk- tionellen Enzyms aus <i>N.crassa</i> und anderen β -Oxidationssystemen 94
3.5	Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von β -Oxidationsenzymen 96
3.5.1	Auftrennung von Zellorganellen im Saccharose- dichtegradienten 97
3.5.2	Osmotischer Aufschluß der Glyoxysomen 102
3.5.3	Immunocytochemischer Nachweis des Trifunk- tionellen Enzyms 105
3.6	Untersuchungen zur strukturellen Organisation des Trifunktionellen Enzyms 107
3.6.1	Bestimmung der Aminosäurekomposition 107
3.6.2	Aminoterminal Sequenzanalyse des Trifunk- tionellen Enzyms 109
3.6.3	Limitierte Proteolyse des Trifunktionellen Enzyms 110
3.6.3.1	Limitierte Proteolyse des nativen Trifunk- tionellen Enzyms 110
3.6.3.1.1	Limitierte Proteolyse mit Trypsin 111
3.6.3.1.2	Limitierte Proteolyse mit Chymotrypsin, V8- Protease und Elastase 115
3.6.3.1.3	Vergleich der proteolytischen Fragmente aus Verdauungsansätzen mit unterschiedlichen Proteasen 118
3.6.3.2	Limitierte Proteolyse von denaturiertem Tri- funktionellen Enzym und Fragmenten aus der Trypsinverdauung 120

	<u>Seite</u>
3.6.3.3 Immunologische Charakterisierung der Frag- mente des Trifunktionellen Enzyms aus tryptischer Verdauung	124
3.6.3.3.1 Gewinnung von Antiseren gegen proteolytische Fragmente des Trifunktionellen Enzyms	124
3.6.3.3.2 Immunoblotting der proteolytischen Fragmente des Trifunktionellen Enzyms mit unterschied- lichen Antiseren	124
3.6.3.3.3 Immunoblotting der proteolytischen Fragmente des Trifunktionellen Enzyms mit affinitäts- gereinigten Antikörpern	131
3.6.3.3.4 Doppeldiffusionsanalyse nach Ouchterlony	133
3.6.3.4 Versuche zur Isolierung enzymatisch aktiver Fragmente des proteolysierten Trifunktionel- len Enzyms	134
3.6.3.5 Trennung der proteolytischen Fragmente des Trifunktionellen Enzyms zur aminoterminalen Sequenzanalyse	138
3.7 Untersuchungen zur Biosynthese des Trifunk- tionellen Enzyms	144
3.7.1 Isolierung von mRNA aus Neurospora crassa	144
3.7.2 Identifizierung des in vitro Translationspro- duktes des Trifunktionellen Enzyms	145
3.7.3 Vergleich des Molekulargewichtes des in vitro Translationsproduktes des Trifunktionellen Enzyms mit der reifen Proteinuntereinheit	149
3.7.4 Nachweis des in vitro Translationsproduktes und der reifen Proteinuntereinheit des Tri- funktionellen Enzyms in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle der Kulturmedien bei der Anzucht	150
4. Diskussion	151
5. Zusammenfassung	179
6. Literaturverzeichnis	181

ABKÜRZUNGEN

ATP	Adenosintriphosphat
BAEE	Na-Benzoyl-L-Argininethylester
BSA	Bovine Serum Albumine
BTEE	N-Benzol-L-Tyrosinethylester
CFA	Complete Freund Adjuvant
Ci	Curie
CMC	Kritische Mizellbildungskonzentration
CoA	Coenzym A
Da	Dalton
DEHP	Di-(2-ethylhexyl)phthalat
DH	Dehydrogenase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTE	1,4-Dithioerythrit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FAD	Flavonadenindinukleotid
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunglobulin G
LDH	Lactatdehydrogenase
MG	Molekulargewicht
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NAD	Nicotinamiddinukleotid
NEPHGE	Nonequilibrium-pH-Gradientenelektrophorese
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline (10 mM Kaliumphosphat-puffer, pH 7,4, 0,9% (w/v)NaCl)
PITC	Phenylisothiocyanat
PTC	Phenylthiocarbamylat
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	Tris Buffered Saline (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,9% (w/v)NaCl)
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFE	Trifunktionelles Enzym
Tricin	N-Tris(hydroxymethyl)-methylglycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

1. EINLEITUNG

Fettsäuren besitzen zwei wichtige physiologische Funktionen: Erstens sind sie als Bausteine von Phospholipiden und Glykolipiden Bestandteile biologischer Membranen, zweitens tragen sie als Brennstoffmoleküle zur Energiegewinnung bei. Hierzu werden sie in ihrer Speicherform, den Triacylglyceriden, in spezialisierten Geweben abgelagert.

In einem historischen Versuch, in dem zum erstenmal in der Biochemie eine synthetische Markierung zur Untersuchung von Reaktionsabläufen benutzt wurde, gelang 1904 Knoop ein entscheidender Beitrag zur Aufklärung der Fettsäureoxidation. Aus der Verfütterung von Fettsäuren, bei denen das ω -Kohlenstoffatom mit einem Phenylrest verbunden war, und dem anschließenden Nachweis der Abbauprodukte im Urin von Hunden wurde geschlossen, daß Fettsäuren durch Oxidation am β -Kohlenstoffatom abgebaut werden (1). Die Aufklärung des Fettsäurekatabolismus gelang in den fünfziger Jahren und konnte von Lynen in seinen Einzelreaktionen aufgezeigt werden (2,3).

Die ungesättigten Fettsäuren werden ebenso wie die gesättigten durch β -Oxidation abgebaut (4). Der Abbau ungesättigter Fettsäuren bedarf aber aufgrund des Vorkommens von Doppelbindungen in der cis-Konfiguration zusätzlicher Enzyme, um die entstehenden Metabolite wieder der β -Oxidation zugänglich zu machen. Wenn die cis-Doppelbindungen an ungeradzahligen Kohlenstoffatomen der nicht abgebauten, ungesättigten Fettsäuren sitzen, werden durch sukzessive Kettenverkürzung 3-cis-Enoyl-CoA-Thioester erhalten, die durch die 3-cis,2-trans-Enoyl-CoA Isomerase in das 2-trans-Isomer, einem "klassischen" β -Oxidationssubstrat, überführt werden (5-7). Stoffel und Mitarbeiter nahmen an, daß der Abbau ungesättigter Fettsäuren, die cis-Doppelbindungen an geradzahligen Kohlenstoffatomen besitzen, durch β -Oxidation solange voranschreitet, bis die cis-Doppelbindungen das C-Atom in Position 2 erreichen. Die nicht an die geometrische Konfiguration der Doppelbindung gebundene 2-Enoyl-CoA Hydratase bewirkt die Entstehung von D-3-Hydroxyacyl-CoA-Thioester (8,9). Ein zusätzliches Enzym, die

3-Hydroxyacyl-CoA Epimerase katalysiert die Überführung der D-3-Hydroxyacyl-CoA-Verbindungen in die L-Isomere (5,8).

Jedoch konnten Kunau und Mitarbeiter zeigen, daß Intermediate mit 2-cis-Doppelbindung beim Abbau ungesättigter Fettsäuren nicht auftreten, sondern die cis-Doppelbindung in Position 4 durch einen Reduktionsschritt ohne begleitende Kettenverkürzung beseitigt wird (10). Das entsprechende Enzym, die NADPH-abhängige 2,4-Dienoyl-CoA Reduktase, konnte in Rinder- (11) und Rattenleber (12) sowie in ölsäureinduzierten Zellen von Candida tropicalis (13) und Escherichia coli (11,14) nachgewiesen werden.

Der Abbau der Fettsäuren durch β -Oxidation ist ein Stoffwechselweg, dessen Vorkommen sich nicht nur auf die Säugetiere beschränkt, sondern zu dem auch Pflanzen sowie eukaryotische und prokaryotische Mikroorganismen befähigt sind.

In Prokaryonten wurde die β -Oxidation molekular bisher ausführlich nur in E.coli untersucht. Die Synthese der β -Oxidationsenzyme wird hier durch Wachstum des Bakteriums auf langkettigen Fettsäuren als einziger Kohlenstoffquelle induziert (15,16). Ein Multienzymkomplex mit einer $\alpha_2\beta_2$ -Struktur der Untereinheiten (α 78 kDa, β 42 kDa) konnte von Schulz und Mitarbeitern gereinigt werden, der die Enzymaktivitäten von 2-Enoyl-CoA Hydratase, L-3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase, 3-Oxoacyl-CoA Thiolase, 3-Hydroxyacyl-CoA Epimerase und 3-cis,2-trans-Enoyl-CoA Isomerase trägt (17-19). Während die 3-Oxoacyl-CoA Thiolase auf der 42 kDa β -Untereinheit lokalisiert ist, befinden sich alle übrigen Enzymaktivitäten auf der 78 kDa α -Untereinheit (19,20). In Bezug auf genetische Studien von Overath et al. konnte nahegelegt werden, daß die Gene für die erwähnten Enzymaktivitäten zu einem einzigen Operon zusammengefaßt sind (15,20,21).

Multienzymkomplexe wurden außerdem in jüngster Zeit von Pseudomonas putida, P. fluorescens, P. maltophilia, P. diminuta, P. cepacia, P. acidovorans und Acinetobacter calcoaceticus nachgewiesen. Sie bestehen ebenfalls aus einer kleinen und großen Untereinheit, die sich gelelektrophoretisch unwe-

sentlich von den Untereinheiten des β -Oxidationskomplexes aus E.coli unterscheiden (22,23).

Der Abbau von Fettsäuren wurde zunächst nur in Säugetiergeweben untersucht, und man nahm an, daß die β -Oxidation auf das mitochondriale Kompartiment beschränkt sei. Jedoch wurde mit der Entdeckung eines bis dahin nicht nachgewiesenen Zellorganellentypus, den Microbodies (24), sowie der nachfolgenden Untersuchung der hierin lokalisierten Enzymausstattung (ein geschichtlicher Rückblick findet sich in (25)) bald offensichtlich, daß die meisten Microbodies die Fähigkeit zum Fettsäureabbau in sich tragen.

Während in den verschiedensten Säugetiergeweben (26) die β -Oxidation sowohl in den Mitochondrien als auch in den Microbodies stattfindet, scheint die intrazelluläre Lokalisation der fettsäureabbauenden Enzyme in den bisher untersuchten Pflanzen und eukaryotischen Mikroorganismen lediglich auf die Microbodies beschränkt zu sein.

Der Begriff "Microbody" wurde 1954 erstmals von Rhodin verwendet und ist der morphologische Ausdruck für ein Zellorganell, das zunächst in Zellen des proximalen Tubulus des Mäusenierengewebes nachgewiesen wurde (24). Microbodies haben einen Durchmesser von 0,2 - 1,5 μm und werden von einer einzigen Lipidbilayer-Membran begrenzt, die eine granuläre Matrix von löslichen Enzymen umgibt. Sie besitzen keine inneren Membranen, oft aber, in Abhängigkeit zum Gewebe, verdichtete Einschlüsse von Protein mit kristalloider Struktur. Das morphologische Erscheinungsbild der Microbodies variiert stark von schmalen, tubulären über sphärischen bis hin zu kompliziert aufgebauten, pleomorphen Kompartimenten.

Die biochemische Charakterisierung der Microbodies begann in den sechziger Jahren. Von dieser Zeit an wurden unterschiedliche Termini für das Zellorganell geprägt, die alle der zuvor beschriebenen morphologischen Definition der Microbodies entsprechen.

De Duve und Mitarbeiter entdeckten bei der Subfraktionierung der mitochondrialen Fraktion aus Rattenleber Zellorganellen, die aufgrund des darin vorkommenden Wasserstoffperoxidstoffwechsels Peroxisomen genannt wurden (27,28). Peroxisomen sind durch Anwesenheit von zumindest einer H_2O_2 -produzierenden Oxidase und einer Katalase definiert.

Breidenbach und Beevers gelang 1967 im Endosperm des Rizinusamens die Isolierung von Microbodies, die durch die Anwesenheit der fünf Enzyme des Glyoxylatzyklus charakterisiert waren und daher als Glyoxysomen bezeichnet wurden (29). In den Glyoxysomen wurden wie in den Peroxisomen Katalase- und Oxidaseaktivitäten nachgewiesen (30).

Im Glyoxylatzyklus werden zwei Acetylreste in Nebenschlußreaktionen des Citratzyklus zu Succinat kondensiert, so daß eine Nettosynthese von Kohlenhydraten aus Fettsäuren möglich ist. Hierzu sind fünf Enzyme notwendig: Isocitratlyase, Malatsynthase, Malatdehydrogenase, Citratsynthase und Aconitase. Es scheint die Regel zu sein, daß in den höheren Pflanzen diese fünf Enzyme gemeinsam in den Glyoxysomen lokalisiert sind. Dagegen liegen Befunde vor, daß in Tetrahymena pyriformis (31), Euglena gracilis (32), Candida tropicalis (33), Aspergillus tamaraii (34), Neurospora crassa (35,36), Coprinus lagopus (37) und sogar in der Harnblase von Bufo marinus (38) lediglich die "bypass"-Enzyme des Glyoxylatzyklus, Malatsynthase und Isocitratlyase, in den Microbodies zu finden sind. Die anderen Enzymaktivitäten, die Bestandteil des Citratzyklus sind, werden nur in den Mitochondrien angetroffen. Allgemein werden auch solche Microbodies als Glyoxysomen bezeichnet (39).

Die enzymatische Ausstattung der Glyoxysomen in fettspeichernden Samenpflanzen verändert sich in Abhängigkeit zum Entwicklungsstadium und steht in direkter Beziehung zu ihrer physiologischen Funktion. Am Anfang der Keimung liegen viele in der unmittelbaren Nähe von Lipidtropfen befindliche Glyoxysomen vor. Nach dem Ergrünen der Keimblätter jedoch findet man sogenannte Blattperoxisomen vor, die oft den Chloroplasten benachbart sind und den photosynthetischen Glycolatstoffwechsel

durchführen. Hierbei taucht ein funktionales Zwischenstadium auf, in welchem die Enzymausstattung von beiden Stoffwechselwegen zu finden ist. Trelease et al. vermuteten, daß sich dieser Übergang aus der Veränderung der Enzymausstattung derselben Microbody-Population ergibt (40), was in der gelegentlich benutzten Bezeichnung "Glyoxyperoxisomen" (41) Ausdruck findet. Beevers dagegen favorisierte ein Modell, das den Übergang durch zwei getrennte Microbody-Populationen erklärte (42). In letzter Zeit jedoch unterstützen biochemische und cytochemische Untersuchungen (41,43,44) sowie direkte immunocytochemische Nachweise durch Doppellabeling-Experimente (45,46) das Ein-Populationsmodell von Trelease.

Von Novikoff et al. wurde der Begriff "Microperoxisomen" geprägt (47), der eine morphologische Beschreibung von sehr kleinen Peroxisomen (ca. 0,2 μm), die meistens keine Einschlüsse besitzen, sich oft in der Nähe des Endoplasmatischen Retikulums befinden und bisher nur zur Bezeichnung in Säugetiersystemen Anwendung gefunden hat (47-50).

In einigen Haemoflagellaten, verschieden zu den Trypanosomatidae zählenden Trypanosoma-, Leishmania- und Crithidia-Arten (51,52), wurden Microbodies nachgewiesen, die durch die Anwesenheit von einigen Enzymen der Glykolyse gekennzeichnet sind und daher als Glycosomen bezeichnet werden.

Der Metabolismus der Microbodies ist von unterschiedlichen Faktoren abhängig, wie dem vorliegenden Gewebe, dem Substratangebot oder dem Entwicklungsstadium. Seitdem Lazarow und de Duve 1976 erstmals in Rattenleber ein peroxisomales β -Oxidationssystem neben dem in den Mitochondrien lokalisierten nachweisen konnte (53), gilt der Fettsäureabbau als ein wichtiger, genereller Stoffwechselweg in Microbodies.

Zuvor konnte die Fettsäureoxidation in Microbodies 1969 zuerst in keimenden Rizinussamen nachgewiesen werden (54), wenig später dann in Tetrahymena pyriformis (55,56), wo gleichzeitig ein peroxisomales und ein mitochondriales β -Oxidationssystem vorliegt, Euglena gracilis (32) sowie in anderen Algen (57), in Leishmania spp. (52), wie auch in verschiedenen tierischen und menschlichen Geweben (26).

In Hefen konnte die β -Oxidation nach Wachstum auf n-Alkanen bzw. langkettigen Fettsäuren in Peroxisomen von Candida tropicalis (58,59) und Candida lipolytica (60) lokalisiert werden. Die Zunahme der Aktivität der am Fettsäureabbau beteiligten Enzyme ging mit einer Zunahme der in den Zellen nachweisbaren Peroxisomen einher (61). Die Induktion von β -Oxidationsenzymen in Hefen durch Ölsäure begleitet von einer gesteigerten Peroxisomenproliferation gelang vor kurzer Zeit außerdem in Hansenula polymorpha, Trichosporon cutaneum, Pichia pastoris und Saccharomyces cerevisiae (22,62).

Es gibt, soweit untersucht, offensichtlich zwei verschiedene β -Oxidationssysteme, ein mitochondriales und ein peroxisomales. Das mitochondriale β -Oxidationssystem scheint lediglich auf tierische Zellen und einige Protisten beschränkt, das in den Microbodies lokalisierte, peroxisomale dagegen scheint sowohl im Tier- als auch im Pflanzenreich und in eukaryotischen Mikroorganismen anzutreffen zu sein. Jedoch gibt es einige signifikante Unterschiede zwischen diesen beiden β -Oxidationssystemen:

1. In den Mitochondrien ist der Transport von Acyl-CoA durch die innere Membran carnitinabhängig; peroxisomale β -Oxidation dagegen ist vermutlich carnitinunabhängig. Die Funktion der in der Matrix von Rattenleberperoxisomen befindlichen Carnitinoctanoyl- und Carnitinacetyltransferase (63,64) ist unbekannt. Die in Peroxisomen und Mitochondrien von Candida tropicalis lokalisierten Carnitinacetyltransferasen dienen vermutlich dem "Shuttle" von Acetylgruppen aus der β -Oxidation zu den Mitochondrien zur Kondensation mit Oxalacetat (Glyoxylatzyklus) (65).

2. Das β -Oxidationssystem der Microbodies ist induzierbar. In Säugetieren konnte gezeigt werden, daß hypolipidämische Arzneistoffe, zumeist Aryloxyalkansäure-Derivate und somit strukturelle Analoga von Clofibrat, sowie Phthalsäureester wie Di-(2-ethylhexyl)phthalat (Xenobiotika) gewebespezifisch die hepatische Peroxisomenproliferation induzieren (66,67).

Peroxisomen nehmen bei maximaler Induktion bis zu 25% des cytoplasmatischen Volumens ein, einhergehend mit zunehmender Hepatomegalie. Die Katalaseaktivität und -synthese wird weniger als 2-fach (68), die Enzyme des peroxisomalen β -Oxidationssystems dagegen 20-fach und mehr induziert (53). In der Rattenleber konnte nachgewiesen werden, daß die Peroxisomenproliferatoren die Transkriptionsrate der β -Oxidationsgene erhöhen (69). Über den Mechanismus der Regulation der Transkription sowie über die Hepatocarcinogenese in Folge der Verabreichung der nicht-mutagen und nicht-genotoxisch wirkenden Peroxisomenproliferatoren ist bislang nichts bekannt (70).

In höheren Pflanzen enthalten die Glyoxysomen fettspeichernde Samen ein peroxisomales β -Oxidationssystem und die Enzyme des Glyoxylatzyklus (29,54). Diese Enzymaktivitäten nehmen nach dem Ergrünen der Keimblätter jedoch wieder ab, und es entstehen Blattperoxisomen, die den Glycolat-Stoffwechsel beinhalten. Jedoch konnte auch in nicht-glyoxysomalen Peroxisomen (Blattperoxisomen, nicht-spezialisierte Peroxisomen) höherer Pflanzen ein β -Oxidationssystem nachgewiesen werden (71). Die Existenz eines mitochondrialen β -Oxidationssystems in Kotyledonen von Pisum sativum L. wird gegenwärtig diskutiert (71,72).

Das β -Oxidationssystem von eukaryotischen Mikroorganismen wird durch Wachstum auf n-Alkanen oder langkettigen Fettsäuren induziert. Im elektronenmikroskopischen Bild füllt dann eine große Anzahl von Microbodies das Zellplasma (22,32, 33,62).

3. Zwar entsprechen die Reaktionen der peroxisomalen β -Oxidation denen des mitochondrialen Systems, jedoch besitzen Peroxisomen eine andere Enzymausstattung.

Die Einführung einer trans-Doppelbindung in Position 2 der Acyl-CoA-Thioester stellt die erste Reaktion der β -Oxidation dar. In den Mitochondrien von Säugetierzellen wird diese Reaktion von drei flavinhaltigen Acyl-CoA Dehydrogenasen katalysiert, die sich durch ihre Kettenlängenspezifität unterscheiden und daher als "short chain"-, "general" und

"long chain"-Acyl-CoA Dehydrogenasen bezeichnet werden. Alle drei Enzyme konnten aus Leber (73-77), Niere (78) und Herz (74,79) verschiedener Säugetiere isoliert werden und sind tetramere Proteine mit Molekulargewichten zwischen 168-205 kDa. Der "general"-Acyl-CoA Dehydrogenase kommt besondere Bedeutung beim Abbau ungesättigter Fettsäuren zu, weil sie eine hohe Affinität zu 4-cis-Decenoyl-CoA-Substraten zeigt (75). Die freiwerdenden Elektronen übernimmt ein elektronenübertragendes Flavoprotein (electron transferring flavoprotein, ETF) (80), das diese auf ein weiteres, eisenschwefelhaltiges Flavoprotein, die ETF-Dehydrogenase, überträgt, die Ubichinon reduziert und die Elektronen somit in die mitochondriale Atmungskette einschleust (81).

Das erste Enzym der β -Oxidationsspirale in Peroxisomen dagegen ist eine Acyl-CoA Oxidase, deren prosthetische Gruppe FAD die freiwerdenden Elektronen auf molekularen Sauerstoff überträgt, wobei H_2O_2 gebildet wird. Das Enzym konnte aus Rattenleber gereinigt werden und besteht aus drei Untereinheiten: A (72 kDa), B (52 kDa) und C (21 kDa) (82). Die Acyl-CoA Oxidase wird in der Größe der Untereinheit A synthetisiert (83,84) und vermutlich in den Peroxisomen in die Untereinheiten B und C gespalten (84-86). Das reife Enzym liegt wahrscheinlich als eine Mischung von A_2 , ABC und B_2C_2 vor (87). Acyl-CoA Oxidase aus Candida tropicalis ist ein Octamer aus Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 76 kDa. Erst kürzlich gelang die Isolierung der Acyl-CoA Oxidase aus den Keimblättern von Cucumis sativus, welche ein Molekulargewicht von 150 kDa aufweist und ein Dimer aus Untereinheiten von 72 kDa darstellt (88).

Die zweite und dritte Reaktion der β -Oxidation wird in Mitochondrien von zwei molekular unabhängigen Enzymen katalysiert. Die 2-Enoyl-CoA Hydratase, welche die Addition von H_2O zu 3-Hydroxyacyl-CoA-Estern katalysiert, konnte aus mehreren Säugetierorganen, darunter Rinderleber (89), Rattenleber (90) und Schweineherz (91) gereinigt und charakterisiert werden. Es handelt sich hierbei um hexamere Proteine mit einem Molekulargewicht von 155-164 kDa aus identischen Unter-

einheiten von 26-28 kDa. Die L-3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase oxidiert die 3-Hydroxygruppe der Acyl-CoA-Ester zur 3-Oxo-gruppe. Dieses Enzym wurde insbesondere im Schweineherzmuskel (92) und in der Rattenleber (93) untersucht und ist ein aus identischen Untereinheiten von 32 kDa aufgebautes Dimer mit einem Molekulargewicht von 65-70 kDa.

Die bisherigen Untersuchungen ließen vermuten, daß in peroxisomalen β -Oxidationssystemen diese beiden Reaktionen prinzipiell von multifunktionellen Proteinen katalysiert werden. Diese Annahme begründete sich am Beispiel von nur drei Proteinen: Aus Rattenleberperoxisomen (94) sowie aus Glyoxysomen von Gurkenkotyledonen (95) konnten monomere bifunktionelle Proteine mit einem Molekulargewicht von 78 kDa bzw. 75 kDa gereinigt werden. In Candida tropicalis hingegen konnte ein größeres, trifunktionelles Enzym gereinigt werden, welches ein Dimer aus zwei Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 102 kDa darstellt und zusätzlich 3-Hydroxyacyl-CoA Epi-meraseaktivität aufweist (96).

Bei der vierten Reaktion findet eine Kettenverkürzung der 3-Oxoacyl-CoA-Ester durch Abspaltung von Acetyl-CoA unter Beteiligung von freiem Coenzym A statt, welche von der 3-Oxo-acyl-CoA Thiolase katalysiert wird. In Mitochondrien aus Rinder- und Rattenleber (97-99) sowie aus Schweineherz (100) konnten jeweils zwei unterschiedliche Thiolasen nachgewiesen werden, von denen eine spezifisch für Acetoacetyl-CoA ist und vermutlich an der Ketogenese, die andere an der β -Oxidation beteiligt ist. Diese Proteine sind Tetramere, von denen die Thiolase aus Rattenleber ein Molekulargewicht von 154 kDa aufweist (99).

Die bisher gereinigten peroxisomalen Thiolasen unterscheiden sich von den mitochondrialen Proteinen in ihrer Quartärstruktur, die Untereinheiten hingegen besitzen ähnliche Molekulargewichte. Die Thiolasen aus Rattenleberperoxisomen (99) und Glyoxysomen aus Gurkenkotyledonen (101) sind Dimere, deren Untereinheiten ein Molekulargewicht von 40 kDa bzw. 45 kDa besitzen. Vor kurzer Zeit gelang auch die Reinigung der Thiolasen aus den Peroxisomen von Candida tropicalis, C.lipo-

lytica und Saccharomyces cerevisiae, die ebenfalls dimere Proteine darstellen, deren Untereinheiten ein Molekulargewicht zwischen 45 kDa und 48 kDa aufweisen (22).

Die bisherigen Untersuchungen zur molekularen Ausstattung der Microbodies werden insbesondere mit dem Ziel durchgeführt, einerseits Einblick in das Stoffwechselgeschehen der Organellen unterschiedlicher Organismen zu erlangen, andererseits die Biogenese der Microbodies und damit wichtige Mechanismen des Proteintransports innerhalb der Zelle aufzuklären. Die intrazelluläre Topologie ist ein wesentlicher Aspekt der Biosynthese von Proteinen und wurde von Blobel mit dem Begriff "Intrazelluläre Proteintopogenese" umschrieben (102). Gemeint sind hierbei die Vorgänge, die während bzw. nach der Biosynthese an den Ribosomen stattfinden und zur Translokation durch bzw. Integration in zelluläre Membranen führen. Durch solche Untersuchungen erhofft man sich auch Aussagen über die phylogenetische Beziehung unterschiedlicher Systeme zu erhalten.

Das in Microbodies befindliche β -Oxidationssystem scheint hierfür ein besonders geeignetes Modell zu sein. Das begründet sich zunächst in der Morphologie und der im Vergleich zu den Mitochondrien überschaubaren Proteinausstattung der Organellen, weiterhin auch in der in Säugetiergeweben vorliegenden dualen Verteilung von β -Oxidationssystemen zwischen Mitochondrien und Peroxisomen, die vergleichende Betrachtungen ermöglicht.

Problemstellung:

Die Untersuchung der molekularen Ausstattung der in den Microbodies lokalisierten β -Oxidation war bislang auf verschiedene Säugetiergewebe (besonders Rattenleber) und höhere Pflanzen (insbesondere Gurkensamen) beschränkt. In eukaryotischen Mikroorganismen dagegen lagen gesicherte Erkenntnisse nur von einer Hefe, Candida tropicalis, vor.

Kürzlich gelang Kionka und Kunau zum ersten Mal auch bei einem Vertreter der filamentösen Pilze, Neurospora crassa, ein

induzierbares β -Oxidationssystem nachzuweisen (103). Nach isopyknischer Zentrifugation von Rohhomogenaten acetat- bzw. ölsäureinduzierter Hyphen konnte gezeigt werden, daß die Enzymaktivitäten β -Oxidation im Saccharosegradienten bei einer Dichte gemeinsam mit den Leitenzymen des Glyoxylatzyklus, Isocitratlyase und Malatsynthase, sedimentierten. Diese partikulären Fraktionen trennten sich deutlich sowohl von dem mitochondrialen Leitenzym Fumarase als auch von Partikeln, die Katalaseaktivität enthielten, ab.

Diese Befunde bestätigten zuvor durchgeführte Untersuchungen von Theimer et al. in acetatinduzierten Zellen einer zellwandlosen "slime"-Mutante von Neurospora crassa. Biochemische und cytochemische Untersuchungen machten dort das Vorliegen von zwei unterschiedlichen Microbodytypen, einem peroxisomalen und einem glyoxysomalen, wahrscheinlich (104,105).

Kunau und Kionka bestimmten anstelle der die peroxisomalen β -Oxidationsenzyme kennzeichnenden Acyl-CoA Oxidase überraschend eine Acyl-CoA Dehydrogenaseaktivität (103). Da in den Partikeln, in welchen alle β -Oxidationsaktivitäten nachgewiesen wurde, auch Katalase und Uricase nicht meßbar waren, scheinen diese "glyoxysomenähnlichen" Partikel sich von anderen Microbodies, die ein β -Oxidationssystem beinhalten, dadurch zu unterscheiden, daß ihnen peroxisomale Eigenschaften fehlen.

Eine Ausnahme bezüglich der Verteilung der β -Oxidationsaktivitäten im Saccharosegradienten bildete die 2-Enoyl-CoA Hydratase, die nicht nur in den Fraktionen der glyoxysomenähnlichen Organellen, sondern auch in den mitochondrialen Fraktionen gemessen wurde (103).

Die Beziehung dieses neuen nicht-mitochondrialen, aber auch nicht-peroxisomalen β -Oxidationssystems in Neurospora crassa zu den bisher bekannten Systemen sollte durch die Reinigung und Charakterisierung der Enzyme 2-Enoyl-CoA Hydratase und L-3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase untersucht werden. Diese Enzymaktivitäten waren in den bisher untersuchten peroxisomalen β -Oxidationssystemen zu einem multifunktionellen Protein

zusammengefaßt (94-96). Wenn dieses β -Oxidationssystem eher dem mitochondrialen Typ ähnelte, wie es die Messung der Acyl-CoA Dehydrogenase nahelegte, war die Isolierung molekular unabhängiger Proteine zu erwarten. Weiterhin sollte die Gewinnung monospezifischer Antiseren die Voraussetzungen für grundlegende Untersuchungen der Biosynthese der in den Microbodies lokalisierten β -Oxidationsenzyme schaffen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien und Radiochemikalien

Bacto Agar, Bacto Yeast Extrakt, Potatoextrakt, Agar Noble und Freund's komplettes Adjuvans wurden von der Firma Difco Laboratories, Detroit, Michigan (USA) geliefert.

Coenzym A, NAD sowie die in Enzymbestimmungen eingesetzten Hilfsenzyme lieferte Boehringer, Mannheim (BRD).

Phosphocellulose P-11 stammte von Whatman, Maidstone, Kent (England).

Deutsche Pharmacia, Freiburg (BRD) lieferte Sephacryl S-300 superfine, Blue Sepharose CL-6B, Protein A-Sepharose CL-4B, Oligo-dT-Cellulose (Type 7), Blue Dextran 2000, Agarose C und NAD-Agarose (Type 1).

Matrex Gel Red A stammte von der Firma Amicon, Witten (BRD). Von LKB, Bromma (Schweden) wurde Ultrogel HA bezogen.

Tricin, D,L-Isocitrat, L-Malat, BSA sowie Tergitol NP 40 stammte von Sigma, München (BRD).

Acrylamid, Bisacrylamid, SDS, Triton X-100, INT und Servalyt Ampholyte (T 3-10, AG 3-7, T 4-9) wurde bei Serva, Heidelberg (BRD), gekauft.

L-[³⁵S]-Methionin, das Translation Kit und Enhancer zur Fluorographie wurde von New England Nuclear, Boston (USA) bezogen.

Die Firma Kodak lieferte X-Omat AR Röntgenfilme (12,8 cm x 17,7 cm), Röntgenentwickler LX-24 und Röntgenfixierer AL 4. Meldolablau (8-Dimethylamino-2,3-benzophenoxaziniumchlorid) war ein Geschenk der Firma Sandoz, Basel (Schweiz).

Ungesättigte Fettsäuren und Acyl-CoA-Ester wurden nach der Methode von Kunau und Dommes (106) von Frau U. Dormmund, Ruhr-Universität Bochum, synthetisiert.

Alle anderen verwendeten Chemikalien waren von p.A.-Qualität und stammten von den üblichen, in der BRD vertretenen Herstellerfirmen.

2.2. Mikroorganismus

Neurospora crassa, Stamm 740 R8-1a, wurde von der Deutschen Gesellschaft für Mikroorganismen, Göttingen (BRD), bezogen.

2.3 Versuchstiere

Zur Immunisierung verwendete Kaninchen wurden von der Firma Gierlich, Bochum (BRD), erhalten. Zu Beginn der Versuche waren die Tiere etwa 3 Monate alt und besaßen ein Gewicht von 3 - 4 kg.

2.4 Antiseren

Goat-anti-Rabbit IgG(H+L), gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase, wurde von der Firma Biogenzia, Bochum (BRD), bezogen. Gereinigtes Trifunktionelles Enzym aus Candida tropicalis, das entsprechende Antiserum, wurden von Frau M. Moreno de la Garza, Antiserum gegen Katalase aus N. crassa von Frau A. Ledebur zur Verfügung gestellt.

2.5 Kultur von Neurospora crassa

Zur Anlegung von Dauerkulturen und zur Bildung von Konidiosporen wurden unter sterilen Bedingungen N. crassa-Hyphen oder Konidien in 100 ml-Erlenmeyerkolben mit 10-20 ml PSAY-Medium beimpft.

PSAY-Medium

Potatoextrakt	4 g
Saccharose	20 g
Bacto Agar	15 g
Yeast Extrakt	5 g

Die angegebenen Substanzen wurden in einem Liter kochendem Wasser gelöst.

Nach etwa fünf Tagen Wachstum bei 30°C schnürten sich an der Spitze von Lufthyphen Konidien ab, die unter Schütteln mit sterilem Wasser geerntet wurden. Die so erhaltenen Konidien-suspensionen wurden routinemäßig auf bakterielle Kontamination untersucht. Die Titerbestimmung erfolgte in einer Neubauerzählkammer. Das Inokulum betrug jeweils 10^5 Konidien pro ml Medium. Die Anzucht in Flüssigkulturen wurde in Vogel's Minimalmedium (107) durchgeführt. Als Kohlenstoffquelle diente Saccharose (2% (w/v)), Natriumacetat (40 mM) oder Ölsäure (1 mM). Allen ölsäurehaltigen Kulturen wurde 1% (w/v) Tergitol NP 40 und zur Verhinderung von Schaumbildung wenig Antischaummittel (Wacker Silicone, Wacker Chemie, BRD) zugesetzt.

Vogel's Minimalmedium

Vogel's Medium (50fach konz.)	20 ml/l
Kohlenstoffquelle: Saccharose	20 g/l oder
Natriumacetat	5,4 g/l oder
Ölsäure	320 µl/l (Zusatz: 1% (w/v) Tergitol NP 40)

Vogel's Medium (50fach konz.)

Natriumcitrat · 2 H ₂ O	150 g
KH ₂ PO ₄ (wasserfrei)	250 g
NH ₄ NO ₃ (wasserfrei)	100 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	10 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	5 g
Lösungen von Spurenelementen	5 ml
Biotinlösung	2,5 ml

wurden bei Raumtemperatur nacheinander in 750 ml destilliertem Wasser gelöst (Endvolumen 1 l).

Lösung von Spurenelementen

In 95 ml destilliertem Wasser wurden bei Raumtemperatur nacheinander die folgenden Substanzen gelöst:

Zitronensäure · H ₂ O	5 g
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	5 g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) · 6 H ₂ O	1 g

$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,25 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,05 g
H_3BO_3 (wasserfrei)	0,05 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,05 g

Biotinlösung

5,0 g Biotin wurden in 50 ml 50%igem (v/v) Ethanol gelöst.

Die Wahl der Kulturgefäße richtete sich nach den von den jeweiligen Versuchsbedingungen geforderten Myzelmenngen. Die Anzucht von Submerskulturen in Erlenmeyerkolben erfolgt bei 25°C und 100 rpm auf einem Wasserbadschüttler (New Brunswick Reciprocating Water Bath Shaker).

Größere Myzelmenngen wurden durch Beimpfen von 10 l Medium mit 40 mM Natriumacetat, 1 mM Ölsäure und 1% (w/v) Tergitol NP 40 (Zusatz von Antischaummittel, s.o.) in Pyrexflaschen mit einem Liter für 48 Stunden (stationäre Phase) auf 40 mM Natriumacetat als Kohlenstoffquelle gewachsenen N.crassa-Hyphen erhalten. Das Wachstum erfolgte unter konstanter Belüftung mit steriler Preßluft (10 ml/min) für 24 h bei 25°C.

Die Ernte der Myzelien erfolgte durch Abnutschen der Kulturen über einen Büchnertrichter. Die abfiltrierten Hyphen wurden dreimal mit destilliertem Wasser nachgespült. Anschließend wurde das Feuchtgewicht der so erhaltenen Myzelien bestimmt.

Wurde längere Aufbewahrung benötigt, wurden die Zellen mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -70°C im Tiefkühlschrank gelagert.

2.6 Zellaufschluß

2.6.1 Aufschlußmedien

Soweit nicht anders angegeben, diente 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1 mM DTE, 0,5 mM Benzamidin (Puffer A) als Aufschlußmedium zur Gewinnung von Rohextrakten für Enzym-

bestimmungen und Proteinreinigungen.

Zur Isolierung von Zellorganellen wurde ein Isolationsmedium (150 mM Tricin pH 7,4, 0,44 M Saccharose, 10 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA) gewählt.

2.6.2 Zellaufschluß durch Mörsern

Der Aufschluß durch Mörsern mit Quarzsand wurde zur Aufarbeitung geringer Myzelmengen und zur Herstellung von Homogenaten zur Organellenisolierung durchgeführt. In einem eisgekühlten Mörser wurde je g Myzelfeuchtgewicht (im Falle von Puffer A unter Zugabe von 1,15 mM PMSF) mit 1 g geglühtem Quarzsand und 4 ml Aufschlußmedium mit Hilfe eines Pistills gerieben, bis ein homogener Zellbrei entstand.

Das Zellhomogenat wurde durch 4 Lagen zuvor mit Aufschlußmedium befeuchtetem Verbandmull filtriert und anschließend bei 4°C zur Herstellung von Rohextrakten 15 min bei 17.000 g, zur Organellenisolierung 5 min bei 2.500 g (Rotor SS 34, Sorvall-Zentrifuge RC-2B) zentrifugiert.

Mit den hieraus resultierenden Überständen wurde weitergearbeitet.

2.6.3 Zellaufschluß mit dem Bead-Beater

Der Aufschluß größerer Myzelmengen zum Zweck der Proteinreinigung wurde mit dem Bead-Beater (Biospec Products, USA) durchgeführt. Hierzu wurden die geernteten Zellen in das zu einem Drittel mit Glasperlen (Durchmesser 0,1 - 0,25 mm) gefüllte Mahlgefäß gegeben. Dieses wurde dann mit Puffer A mit 1,15 mM PMSF aufgefüllt und an den Teflonrotor mit dem Eiswasserkühlmantel angeschlossen. Der Aufschluß erfolgte durch zehnmaliges Mahlen für 15 sec mit Intervallen von je 30 sec, um eine übergroße Erwärmung des Homogenats zu vermeiden.

Das Homogenat wurde anschließend von den Glasperlen abdekantiert; diese wurden mit wenig Puffer A mit 1,15 mM PMSF nachgewaschen. Die Überstände wurden durch vier Lagen Verbandmull filtriert

und im GSA-Rotor bei 17.000 g für 20 min in der Sorvallzentrifuge zentrifugiert.

Der hieraus gewonnene Überstand wurde als Rohextrakt bezeichnet.

2.7 Saccharosedichtegradientenzentrifugation

Die Zellen wurden wie unter 2.6.2 beschrieben in Isolationsmedium aufgearbeitet und 5 min bei 2.500 g im SS 34-Rotor zentrifugiert. 10 ml dieses Homogenates wurden auf 21 ml eines kontinuierlichen Dichtegradienten von 30-60% (w/w) Saccharose in Gradientenpuffer (10 mM Tricin, pH 7,4, 1 mM EDTA) mit einem 2 ml 60%igen Saccharosekissen aufgetragen.

Die anschließende Zentrifugation erfolgte für 90 min mit einem SS 90-Vertikalrotor bei 4°C und 20.000 rpm (48.000 g) in einer Sorvallzentrifuge (Sorvall Superspeed RC-6B). Für die in dieser Zentrifuge eingebaute Beschleunigungskontrolle wurde ein Wert von 70 gewählt.

Die Saccharosegradienten wurden mit Hilfe einer Kanüle vom 60%igen Saccharosekissen beginnend über eine peristaltische Pumpe abgesaugt (45 ml/h), die Proteinabsorption bei 280 nm durch Kopplung an ein Durchflußphotometer (ISCO, Model UA-5 Absorbance Monitor) verfolgt und fraktioniert aufgefangen. Die Saccharosekonzentration der Fraktionen wurde durch ein Refraktometer (Zeiss) ermittelt.

2.8 Aufschluß von Glyoxysomen durch osmotischen Schock

Glyoxysomenfraktionen aus der Saccharosedichtegradientenzentrifugation (2.7) mit einem Saccharosegehalt von 47% (w/w) Saccharose wurden mit 2 Volumenteilen Aqua bidest. versetzt und 1 h auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Proben für 1 h einer Zentrifugation in einer International Ultrazentrifuge im SW-41 Swing-out-Rotor bei 0°C unterzogen (30.000 rpm, 150.000 g_{max}), um die Membranen abzutrennen.

Der resultierende Überstand wurde vorsichtig abgetrennt und als Matrixfraktion in die Enzymbestimmungen eingesetzt.

Das gelblich erscheinende Pellet wurde zur Lösung membrangebundener Proteine in 2 ml 0,1 M $MgCl_2$ resuspendiert und in ein 5 ml Pottergefäß überführt. Die Zentrifugenröhrchen wurden, um vollständige Überführung zu gewährleisten, zweimal mit 0,25 ml 0,1 M $MgCl_2$ nachgespült. Die resuspendierten Membranen wurden dann 10 x im motorgetriebenen Elvehjem-Potter bei 1.500 rpm homogenisiert und als gelöste Membranproteinfraktion in die Enzymbestimmung eingesetzt.

2.9 Säulenchromatographie

Alle säulenchromatographischen Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Der Durchfluß wurde über eine motorgetriebene peristaltische Pumpe (2120 Varioperplex, LKB) bestimmt. Die Aufzeichnung der Proteinabsorption erfolgte über ein an einen Schreiber gekoppeltes Durchflußphotometer (ISCO, Model UA-5 Absorbance Monitor) bei 280 nm. Mittels eines Fraktionskollektors (2070 Ultrorac II, LKB) wurden die Fraktionen aufgefangen.

2.9.1 Kationenaustauschchromatographie an Phosphocellulose P-11

Phosphocellulose P-11 wurde nach den Angaben des Herstellers vorbehandelt und in eine Säule (2,6 cm x 18 cm; Bettvolumen 96 ml) gefüllt. Das Säulenmaterial wurde in Puffer A (2.6.1) mit 1,15 mM PMSF äquilibriert. Nach Auftrag der Probe wurde mit dem gleichen Puffer mit einer Pumpgeschwindigkeit von 30 ml/h gewaschen, bis der an das Photometer angeschlossene Schreiber wieder eine Abnahme der Proteinabsorption auf die Grundlinie zeigte. Anschließend wurde ein linearer, kontinuierlicher Gradient von 0 - 1 M KCl in Puffer A mit 1,15 mM PMSF (2 x 200 ml) angelegt. Die Laufgeschwindigkeit bei der Elution betrug 25 ml/h. Es wurden Fraktionen von 6 ml aufgefangen.

2.9.2 "Dye-ligand"-Chromatographie an Blue Sepharose CL-6B

Das Farbstoffgel wurde nach Angaben des Herstellers in destilliertem Wasser vorgequollen. Die Säulen (1,6 x 10 cm; Bettvolumen 20,1 ml) wurden mit einer Laufgeschwindigkeit von 25 ml/h betrieben.

Methode A: Die Säule wurde mit Puffer A unter Zusatz von 200 mM KCl und 0,12 mM PMSF äquilibriert. Es wurde Sorge getragen, daß vor Auftrag der Proteinprobe die Leitfähigkeit des Säulenpuffers nicht 18 mS überstieg. Nach Auftrag der Probe wurde mit dem gleichen Puffer gewaschen (5-faches Säulenvolumen). Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte mit einem linearen 200 - 1000 mM KCl-Gradienten (2 x 100 ml in Puffer A mit 0,12 mM PMSF). Das aufgefangene Fraktionsvolumen betrug 3 ml.

Methode B: Die Säule wurde mit Puffer A mit 0,12 mM PMSF äquilibriert. Nach Auftrag der Probe wurde mit dem 5-fachen Volumen des Puffers gewaschen und anschließend mit einem 0-1 M KCl-Gradienten (2 x 100 ml) in Puffer A mit 0,12 mM PMSF eluiert. Das Auffangvolumen der Fraktionen betrug 4 ml.

2.9.3 "Dye-ligand"-Chromatographie an Matrex Gel Red A

Das Matrex Gel Red A wurde in eine Säule (1 cm x 12,8 cm; Bettvolumen 10,1 ml) gefüllt. Als Äquilibrierungs-, Wasch- und Elutionspuffer diente Puffer A mit 0,12 mM PMSF. Die Säule wurde nach dem Proteinauftrag mit 5 Säulenvolumen gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem linearen 0-1 M KCl-Gradienten (2 x 50 ml). Die Durchflußrate betrug 25 ml/h, und es wurden Fraktionen von 4 ml gesammelt.

2.9.4 Affinitätschromatographie an NAD-Agarose (Type 1)

Eine 0,8 cm x 3,7 cm große Säule wurde mit NAD-Agarose gefüllt (Bettvolumen 1,9 ml) und mit Puffer B (s.u.) äquilibriert. Das Waschen der Säule wurde nach dem Auftrag der Proteinlösung mit dem gleichen Puffer durchgeführt. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten aus Puffer B und Puffer C (2 x 20 ml). Die Säule wurde mit einer Geschwindigkeit von 12 ml/h gespült. Es wurden Fraktionen von 2 ml aufgetragen.

Die verwendeten Puffer hatten folgende Zusammensetzung:

Puffer B: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA,
1,15 mM PMSF, 1 mM DTE, 0,5 mM Benzamidin

Puffer C: 100 mM Tris-HCl, pH 7,4, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA,
1,15 mM PMSF, 1 mM DTE, 0,5 mM Benzamidin.

2.9.5 Adsorptionschromatographie an Ultrogel HA (Hydroxylapatit)

Zur Säulenchromatographie an Hydroxylapatit von LKB wurden 16 ml Ultrogel in eine Säule (1 cm x 20 cm) gefüllt, mit Puffer D äquilibriert und, nachdem die Probe aufgetragen war, mit dem 5-fachen Säulenvolumen gespült. Das gebundene Protein wurde mit einem linearen Gradienten aus Puffer D und E (2 x 50 ml) eluiert. Die Säulen wurden mit einer Flußrate von 25 ml/h betrieben. Das aufgefangene Fraktionsvolumen betrug 3 ml.

Die Zusammensetzung der Puffer war wie folgt:

Puffer D: 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, 1 mM Benzamidin,
1 mM DTE, 0,12 mM PMSF

Puffer E: 1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, 1 mM Benzamidin,
1 mM DTE, 0,12 mM PMSF

2.9.6 Gelchromatographie an Sephacryl S-300 Superfine

Das Gelmaterial wurde nach den Angaben des Herstellers in eine Säule gepackt (1,4 cm x 103 cm; Bettvolumen 158,5 ml) und mit Puffer F (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0,5 mM Benzamidin, 0,5 mM DTE, 150 mM KCl) äquilibriert. Das Auftragsvolumen der Proteinproben betrug maximal 2 ml. Der Lauf der Säule wurde unter konstanter Durchflußrate von 25 ml/h mit Puffer F gehalten; es wurden Fraktionen von 1,97 ml aufgefangen.

Zur Eichung der Säule zwecks Bestimmung des nativen Molekulargewichtes durch Gelfiltration wurden Alkoholdehydrogenase (aus Pferdeleber; 80.000; Auftrag 1 mg), Lactatdehydrogenase (aus Schweineherz; 140.000; Auftrag 1 mg), Katalase (aus Rinderleber; 235.000; Auftrag 1 mg) und Ferritin (aus Pferd milz; 440.000 bzw. 880.000; Auftrag 2 mg) benutzt. Die Bestimmung des Ausschlußvolumens der Säule wurde mit Blue Dextran 2000 (Pharmacia; Auftrag 2 mg) durchgeführt.

2.10 Polyacrylamidelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (SDS-PAGE)

Die Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen wurde im diskontinuierlichen System nach Lämmli (108) durchgeführt. Als Elektrophoresekammer diente ein System, das aus zwei übereinander angeordneten Elektrodenkammern bestand, die durch ein zwischen Glasplatten gegossenes und vertikal eingespanntes Gel während der Elektrophorese verbunden wurden. Die Lösungen wurden wie folgt hergestellt:

1. Acrylamid-Stammlösung, 20%ig (w/v):

20 g Acrylamid (2 x kristallisiert) und 0,533 g N,N'-Methylenbisacrylamid wurden in bidestilliertem Wasser ad 100 ml gelöst.

2. Acrylamid-Stammlösung, 30%ig (w/v):

30 g Acrylamid (2 x kristallisiert) und 0,8 g N,N'-Methylenbisacrylamid wurden in bidestilliertem Wasser ad 100 ml gelöst.

3. Trenngelpuffer:

1,5 M Tris-HCl, pH 8,8

4. Sammelgelpuffer:

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

5. Ammoniumpersulfat-Lösung, 10%ig (w(v))

6. SDS-Lösung, 20%ig (w(v))

7. Elektrodenpuffer:

3 g Tris; 14,4 g Glycin und 1 g SDS wurden in 1 l bidestilliertem Wasser gelöst (pH 8,3)

8. Probenpuffer:

10 ml Glycerin, 5 ml 2-Mercaptoethanol, 3 g SDS, 12,5 ml Sammelgelpuffer und 0,002 g Bromphenolblau wurden in bidestilliertem Wasser ad 100 ml gelöst.

9. Färbelösung:

1,2 g Serva Blau R-250 (Coomassie Brilliant-Blue) wurden in 45% (v/v) Methanol, 9% (v/v) Eisessig auf 1 l gelöst.

10. Entfärbelösung:

30% (v/v) Methanol, 7,5% (v/v) Eisessig

Die Lösungen für das Gel wurden zwischen zwei Glasplatten (140 mm x 130 mm), die mit Hilfe von 1-4 mm dicken Abstandshaltern auseinandergehalten wurden, eingegossen. Das folgende Pipettierschema zeigt die Zusammensetzung der Gelmischungen:

Lösung	ml Lösung / Gelmischung			
	Trenngel			Sammelgel
	10%	12%	20%	5%
1	15,0	18,0	-	4,0
2	-	-	20,0	-
3	7,5	7,5	7,5	-
4	-	-	-	4,0
5	0,2	0,2	0,2	0,16
6	0,225	0,225	0,225	0,24
A.bidest.	7,1	4,1	2,1	7,6
TEMED	0,02	0,02	0,02	0,016

Die Proben wurden entweder mit dem gleichen Volumen Probenpuffer versetzt oder, falls erforderlich, in 10% (w/v) TCA bei 4°C für mindestens 15 min gefällt und in Probenpuffer aufgenommen (überschüssige TCA wurde mit 1 N NaOH neutralisiert). Die Denaturierung der Proben erfolgte für 5 min bei 100°C.

Die Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur und wurde in Abhängigkeit von der Geldicke bei einer konstanten Stromstärke von 8-45 mA durchgeführt. Die Beendigung der Elektrophorese wurde durch das Erreichen der Bromphenolblaubande an der unteren Trenngelgrenze angezeigt.

Zur Proteinfärbung wurden die Gele bei ca. 60°C in Färbelösung gelegt und unter mehrmaligem Wechsel von Lösung 10 entfärbt.

2.11 Fluorographie

Proteingefärbte Polyacrylamidgele wurden für die Fluorographie 60 min in Enhancer gelegt und dann fünfmal für 5 min gewässert.

Anschließend wurden die Gele für ca. 2 h auf einem Gelrockner (Modell 224, Bio-Rad) getrocknet. Die getrockneten und mit Haushaltsfrischhaltefolie umwickelten Gele wurden bei Rotlicht einem Röntgenfilm aufgelegt und bei -70°C in einer Filmkassette (Dr. Goos) exponiert.

Nach der Belichtung wurden die Filme bei Rotlicht in folgender Weise entwickelt:

- 1) 5 min in Entwickler LX 24 (1:5 verdünnt mit bidestilliertem Wasser)
- 2) 30 sec wässern
- 3) 10 min in Fixierer AL 4 (1:5 verdünnt mit bidestilliertem Wasser)
- 4) 30 min wässern und schließlich an der Luft trocknen

2.12 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Netrocellulose (Western Blotting)

Zum Western Blotting wurden die Gele aus SDS-PAGE unmittelbar nach ihrer elektrophoretischen Auftrennung mit Blotting-Puffer

(s.u.) abgespült und in ein Sandwich nach folgendem Aufbau luftblasenfrei gepackt.

- Rahmenplatte
- Polyethylenschwamm
- 3 Lagen Filterpapier (Whatman 3MM)
- SDS-Polyacrylamidgele (zur Kathode)
- Nitrocellulosefolie (zur Anode)
- 3 Lagen Filterpapier (Whatman 3MM)
- Polyethylenschwamm
- Rahmenplatte

Schwämme, Filterpapiere und Nitrocellulosefolie (Membranfilter), Schleicher + Schuell) wurden zuvor in Blotting-Puffer äquilibriert.

Das Sandwich wurde nun in die Blottingkammer (Eigenbau) gesetzt. Der elektrophoretische Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosefolie erfolgte nun bei Raumtemperatur mit einer Stromstärke von 300 mA für 3 h.

Die Zusammensetzung des Blotting-Puffers lautete:

Blotting-Puffer:

4,05 g Tris, 21,5 g Glycin, 133 ml Methanol auf 1 l bidestilliertem Wasser.

Nach Beendigung des ElektrobloTTings wurde die Nitrocellulosefolie entweder für die anschließende Immunodetektion durch ELISA mit einer 5%igen (w/v) BSA-Lösung in TBS inkubiert (s. hierzu 2.16.6) oder aber zur Proteinfärbung für 5 min in 0,25% (w/v) Amidoschwarz (Serva) in 45% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Eisessig gelegt. Die Entfärbung erfolgte durch einfaches Abspülen der Folie mit Wasser.

2.13 Elektroelution mit nachfolgender Elektrodialyse

Zur Elektroelution und -dialyse wurde die in (109) beschriebene Apparatur verwendet (Eigenbau).

Die Vorbehandlung der Dialysemembranen (Servapor, 16 mm) wurde wie folgt durchgeführt:

- 10 min in 1%iger (w/v) Natriumbicarbonatlösung kochen
- 40 min in 60°C warmer 1%iger (w/v) Natriumbicarbonatlösung erwärmen
- mit Aqua bidest. waschen
- 10 min in 20 mM EDTA kochen
- mit Aqua bidest. waschen
- 10 min mit Aqua bidest. aufkochen
- 40 min in 60°C warmer 0,1%iger (w/v) SDS-Lösung einweichen

Mittels eines Korkbohrers wurden nun kreisförmige Membranstücke ausgestanzt und in die Elutionsbrücken eingesetzt.

Fixierte und gefärbte Gelbanden nach SDS-PAGE (2.10) wurden ausgeschnitten und 2 h in Aqua bidest. eingeweicht (mehrmaliges Wechseln). Die Gelstücke wurden in sehr kleine Würfel zerkleinert und 5 min in Elutionspuffer (0,1% (w/v) SDS, 50 mM NH_4HCO_3) äquilibriert.

Die Gelstücke wurden dann in die Elutionsbrücke eingeführt und mit Soakingpuffer (2% (w/v) SDS, 0,4 M NH_4HCO_3) überschichtet. Die Brücken wurden luftblasenfrei in die mit Elutionspuffer mit 5% (v/v) 2-Mercaptoethanol gefüllte Elutionskammer gesetzt. Nach vierstündiger Vorinkubation wurde die Elektroelution bei 50V konstanter Spannung für 12 h durchgeführt.

Zur Verringerung der Ionenkonzentration und insbesondere zur Herabsetzung der SDS-Konzentration schloß sich hieran die Elektrodialyse. Hierzu wurde der Elutionspuffer in der Elutionskammer durch Dialysepuffer (0,02% (w/v) SDS, 10 mM NH_4HCO_3) ersetzt, und weitere 24 h eine konstante Spannung von 80V angelegt.

Kurz vor Entnahme der Elektroeluat wurde die Stromzufuhr für 1 min umgepolt, um die Proteine von der Membranoberfläche zu lösen.

Alle verwendeten Lösungen wurden vor Gebrauch autoklaviert.

2.14 Zweidimensionale Gelelektrophorese

2.14.1 IEF/SDS-PAGE

Die 2-dimensionale Gelelektrophorese im IEF/SDS-PAGE-System wurde wie von O'Farrell (110) beschrieben durchgeführt mit Modifikationen nach (111).

Die Proben wurden mit 2,5 Volumenteilen Ethanol in Anwesenheit von 100 mM Salz (evtl. Zugabe von Ammoniumacetat) über Nacht bei -20°C gefällt und in 2% (w/v) SDS, 5 mM EDTA, 5% (v/v) 2-Mercaptoethanol aufgenommen. Zur besseren Lösung des Präzipitats wurde die Probe 1 min beschallt und zur Denaturierung 2 min bei 100°C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde 9 M Harnstoff (0,8 mg/μl Probe), danach Servalyt Ampholyte pH 3-10 zu einer Gesamtkonzentration von 4% (v/v) und Nonidet P-40 zu einer Gesamtkonzentration von 10% (v/v) zugefügt.

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) wurde in 12 cm hohem Glasröhrchen mit einem Innendurchmesser von 3 mm durchgeführt. Zur Bereitung der Röhrchengele wurden folgende Lösungen hergestellt:

Acrylamid-Stammlösung I

28,38% (w/v) Acrylamid, 1,62% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid

Lysispuffer I

27,5 g Harnstoff, 6,65 ml Acrylamid-Stammlösung I und 10 ml einer 10%igen (v/v) Nonidet P-40 Lösung wurden auf 50 ml gelöst.

Zur Bereitung von 10 Röhrchengelen wurde der folgende Ansatz pipettiert:

5,5 ml Lysispuffer I

93 μl Servalyt Ampholyte pH 3-10 (Endkonzentration 0,66% (v/v) Ampholyte)

187 μl Servalyt Ampholyte pH 5-7 (Endkonzentration 1,34% (v/v) Ampholyte)

5,5 μl 10%ige (w/v) Ammoniumpersulfat-Lösung

5 μl TEMED

Die Lösung wurde bis zu einer Höhe von 9 cm in die Röhrchen pipettiert und polymerisieren gelassen. Anschließend erfolgte die Präfokussierung nach folgendem Ablauf:

- a) 15 min bei 200 V
- b) 30 min bei 300 V
- c) 30 min bei 400 V

Als Elektrodenpuffer wurden 10 mM H_3PO_4 für die Anode und 40 mM NaOH, 20 mM $\text{Ca}(\text{OH})_2$ für die Kathode verwendet.

Nach erfolgter Präfokussierung wurden die Proben aufgetragen und mit 1% (w/v) Agarose C (Pharmacia) in 0,5 M Harnstoff überschichtet.

Die Elektrophorese wurde dann für 17 h bei einer konstanten Spannung von 400 V durchgeführt. Danach erfolgte eine Hyperfokussierung bei 1000 V für 1 h.

Nach Beendigung der isoelektrischen Fokussierung wurde das Gel in dem Glasröhrchen bei -20°C eingefroren.

Zur Durchführung der 2. Dimension wurde das eingefrorene Gel unter Druck aus den Glasröhrchen gepreßt und 30 min in 5% (v/v) 2-Mercaptoethanol, 3% (w/v) SDS, 62,5 mM Tris-HCl; pH 6,8 äquilibriert. Anschließend wurde das Gel auf das Sammelgel eines 10%igen SDS-Geles (wie unter 2.10 beschrieben, aber mit glatter Oberfläche) gelegt und mit 80°C warmer 1%iger (w/v) Agarose-Lösung mit 0,002% (w/v) Bromphenolblau eingegossen. Die kathodische Seite des Isofokussierungsgeles wurde mit Hilfe einer Probentasche gekennzeichnet, in welche Markerproteine gefüllt wurden. Die Bedingungen des elektrophoretischen Laufs und der Proteinfärbung entsprachen denen einer üblichen SDS-PAGE.

2.14.2 Nonequilibrium-pH-Gradientenelektrophorese (NEPHGE/SDS-PAGE)

Das NEPHGE-System zur Auftrennung der mehr basischen Proteine wurde nach O'Farrell et al. (112) durchgeführt. Die Zusammensetzung des NEPHGE-Gels war identisch mit der Equilibrium-Methode (2.14.1), mit zwei Ausnahmen: Es wurden Servalyt-Ampholyte pH 3-7 und Servalyt Ampholyte pH 4-9 in einer Endkonzentration von je 1% (v/v) eingesetzt, und die Mengen an TEMED

und Ammoniumpersulfat wurden verdoppelt. Die Proben (25 μ l) wurden mit 25 μ l Overlay-Puffer (9 M Harnstoff, 0,5% (v/v) Servalyt Ampholyte pH 3-7, 0,5% (v/v) Servalyt Ampholyte pH 4-9, 5% (v/v) Nonidet P-40, 5% (v/v) 2-Mercaptoethanol) überschichtet. Die Elektrophorese der ersten Dimension wurde mit umgekehrter Polarität durchgeführt; der Auftrag der Probe erfolgte demnach auf der Seite der Anode.

Nach einer Laufzeit von 4 h bei 400 V konstanter Spannung (keine Prä- und Hyperfokussierung) wurde die zweite Dimension wie zuvor beschrieben durchgeführt.

2.15 Limitierte Proteolyse

Zur limitierten Proteolyse fanden folgende Proteasen Anwendung:

1. Trypsin aus Rinderpankreas; unbehandeltes Lyophilisat (Boehringer Mannheim)
2. Trypsin aus Rinderpankreas; TPCK-behandelt (Lyophilisat); 12.500 BAEE units/mg Protein (Angaben des Herstellers: Sigma)
3. α -Chymotrypsin aus Rinderpankreas; TLCK-behandelt (Lyophilisat); 60 BTEE units/mg Protein (Angaben des Herstellers: Sigma)
4. Endoproteinase Glu-C aus *Staphylococcus aureus* V8 (V8-Protease); Lyophilisat (Boehringer Mannheim)
5. Elastase aus Schweinepankreas; Suspension (Boehringer Mannheim)

2.15.1 Limitierte Proteolyse von nativen Proteinproben

Zur Homogenität gereinigtes Protein wurde bei 4°C gegen Proteolysepuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 2 mM EDTA) dialysiert. Die dialysierte Probe wurde anschließend mit der entsprechenden Protease bei 4°C inkubiert.

Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben zur Messung der Enzymaktivitäten entnommen. Zur analytischen Auftrennung durch SDS-Gelelektrophorese wurden die Proben mit 10% (w/v) TCA gefällt und, wie unter 2.10 beschrieben, in Probenpuffer aufgenommen.

Zur Messung der Kinetiken von Verdauungsansätzen mit Trypsin wurde Trypsininhibitor (aus Soyabohne; 1 mg inhibiert 1,9 mg Trypsin mit 10.000 BAEE units/mg protein nach Angaben des Herstellers: Sigma) in einem Verhältnis von 10 mg/mg Trypsin zugegeben.

2.15.2 Limitierte Proteolyse von denaturiertem Protein

Homogene Proteinprobe wurde mit 10% (w/v) TCA gefällt. Das Präzipitat wurde anschließend dreimal mit Aceton gewaschen, trockengesaugt, danach in 125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,5% (w/v) SDS, 10% (v/v) Glycerin und 0,0001% (w/v) Bromphenolblau aufgenommen und 5 min bei 100°C denaturiert.

Mit dieser Probe wurde die limitierte Proteolyse durch Inkubation mit Trypsin (Boehringer Mannheim) für 1 h bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Proteolyse wurde durch Zugabe von 10% (v/v) 2-Mercaptoethanol und 2% (w/v) SDS und anschließendem 5minütigen Kochen im siedenden Wasserbad abgestoppt. Die Proben wurden danach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (2.10) unterworfen.

2.15.3 Limitierte Proteolyse von Fragmenten aus Trypsinverdauung nach Cleveland (113)

Zur Auftrennung der tryptischen Fragmente, die nach 2.15.1 erhalten wurden, wurde die diskontinuierliche Gelelektrophorese nach Lämmli (108) benutzt (2.10). Die Gele wurden, wie bei Cleveland et al. (113) beschrieben, nicht länger als 30 min in Färbelösung angefärbt und, um mögliche saure Hydrolyse zu vermeiden, für weniger als 1 h in 5% (v/v) Methanol und 10% (w/v) Eisessig entfärbt. Die entsprechenden Banden wurden nun mit einem Skalpell ausgeschnitten und dann 30 min in Äquilibrationspuffer (125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% (w/v) SDS und 1 mM EDTA) äquilibriert. An diesem Punkt konnten die Gelstücke, soweit erforderlich, bei -20°C aufbewahrt werden.

Die Gelstücke wurden nun zerkleinert und in die Taschen eines zweiten SDS-Gels (12% Acrylamid-Konzentration) gefüllt, welches

ein längeres Sammelgel als üblich (ca. 5 cm) besaß. Zusätzlich wurden Trenngel- und Sammelgelpuffer mit 1 mM EDTA versetzt. Die Probestaschen wurden nun mit Äquilibrierungspuffer, die Räume um die eingeführten Gelstücke mit 10 µl Äquilibrierungspuffer mit 20% (v/v) Glycerin ausgefüllt. Schließlich wurde eine definierte Menge Trypsin (Sigma) in Äquilibrierungspuffer mit 10% (v/v) Glycerin überschichtet, und die Elektrophorese in üblicher Weise durchgeführt, mit der Ausnahme, daß die Stromzufuhr für 30 min unterbunden wurde, als die Bromphenolblaubande die untere Sammelgelgrenze erreicht hatte.

Die Gele wurden entweder nach Beendigung der zweiten Gelelektrophorese gefärbt und entfärbt, oder zur Erhöhung der Sensitivität dem elektrophoretischen Transfer auf Nitrocellulose mit anschließendem ELISA (Immunoblotting, s. 2.16.6) unterzogen.

2.16 Immunologische Methoden

2.16.1 Gewinnung von Antiseren

2.16.1.1 Gewinnung von Antiseren durch Immunisierung mit Proteinlösungen

Zur Gewinnung polyklonaler Antiseren wurden Lösungen bis zur Homogenität gereinigten Proteins in PBS (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,9% (w/v) NaCl) dialysiert und anschließend mit dem gleichen Volumen kompletten Freund'schen Adjuvans (CFA, DIFCO) versetzt. Diese Mischung wurde zwischen zwei mit einem enghalsigen Kupplungsstück verbundenen Glasspritzen solange verteilt, bis eine stabile Emulsion entstand.

Zur Primärinjektion wurden 250-500 µg Protein verwendet. Die folgenden Boosterinjektionen mit ca. 250 µg Protein wurden in 9- bis 15tägigen Abständen durchgeführt. Die Immunisierung der Kaninchen erfolgte durch intramuskuläre Injektionen in die Hinterläufe der Tiere.

Fünf Tage nach jeder Injektion wurde aus den Ohrarterien zur Kontrolle des Antiserums Blut entnommen. Das aufgefangene Blut

wurde zur Gerinnung 1 h bei Raumtemperatur und dann 4-15 h bei 4°C in SS34-Zentrifugenröhrchen stehengelassen. Zur Entfernung zellulärer Bestandteile wurde dann 15 min bei 3000 g zentrifugiert. Der so erhaltene Überstand wurde als Antiserum eingesetzt.

Nach Erreichen des gewünschten Antiserumtiters wurden die Tiere unter Narkose durch Herzpunktion entblutet.

Zur Gewinnung von Präimmunserum wurde unmittelbar vor der Primärinjektion Blut entnommen.

2.16.2 Gewinnung von Antiseren durch Immunisierung mit denaturierten Proben nach SDS-PAGE

Nach elektrophoretischer Auftrennung von Proteinproben über SDS-PAGE wurden die entsprechenden proteingefärbten Banden aus dem Gel ausgeschnitten und unter mehrmaligem Wechsel des Puffers (Kontrolle des pH-Wertes) in PBS äquilibriert. Die Gelstücke wurden in eine Glasspritze gefüllt und unter Zuhilfenahme von wenig PBS durch Pressen zwischen zwei mit einem enghalsigen Kupplungsstück verbundenen Glasspritzen solange zerrieben, bis möglichst große Homogenität vorlag. Anschließend wurde das gleiche Volumen CFA zugegeben, und der Ansatz bis zur stabilen Emulsion weiterverarbeitet.

Im Abstand von 14-28 Tagen wurde an möglichst vielen verschiedenen Körperstellen des Rückenfalls und der Hinterläufe der Kaninchen subcutan injiziert. Die Gewinnung von Präimmunserum und Antiserum erfolgte wie unter 2.16.1.1 beschrieben.

2.16.2 Doppeldiffusionsanalyse nach Ouchterlony (114)

Es wurde eine 1%ige (w/v)-Agarlösung durch Kochen von Agar Noble (DIFCO) in TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,9% (w/v) NaCl) hergestellt. 15 ml dieser Lösung wurden auf eine Glasplatte (10 cm x 10 cm) pipettiert. Nach Erstarren des Agars wurden die Depots mit einem Fassungsvermögen von ca. 10 µl in einem Abstand von 8 mm ausgestantzt. Das Einfüllen von Seren und Proteinlösungen

(Antigenen) wurde auf Eis durchgeführt. Die Diffusionsdauer betrug 24-48 h bei Raumtemperatur in einer luftfeuchtigkeitsgesättigten Kammer. Die Immunpräzipitate waren als weiße Banden sichtbar. Zur Erhöhung der Sensitivität durch Coomassie-Färbung bzw. zur Aufbewahrung wurden die Agarplatten dreimal mit (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,9% (w/v) NaCl, 0,1% (v/v) Triton X-100, 0,02% (w/v) Natriumazid) und anschließend zweimal mit bidestilliertem Wasser für je 5-12 h gewaschen und dann 2-3 h bei 40°C im Trockenschrank getrocknet. Die so behandelten Platten wurden 5 min in Färbelösung für SDS-PAGE (2.10) gelegt, mit Entfärbelösung gespült und danach erneut für 2 h bei 40°C getrocknet.

2.16.3 Immunelektrophorese nach Grabar und Williams (115)

25 ml einer Lösung von 1% (w/v) Agarose C in Veronalpuffer (4,25 mM Natriumdiethylbarbitursäure, pH 8,6, 20 mM Natriumacetat, 15,4 mM Natriumazid) wurden auf eine Glasplatte (10 cm x 10 cm) pipettiert, und nach Erstarren der Agarose wurde ein Depot ausgestanzt, in welches Antigenlösung eingefüllt wurde. In zwei gegenüberliegenden Elektrodenkammern, zwischen denen die Agaroseplatte über zwei mit Veronalpuffer befeuchteten Chromatographiepapieren (Whatman 3MM) verbunden war, wurde Veronalpuffer als Elektrodenpuffer eingefüllt. Die Elektrophorese wurde für zwei Stunden bei einer konstanten Spannung von 10 V/cm Laufstrecke durchgeführt.

Nach abgeschlossener Elektrophorese wurde eine Rinne ausgehoben, in welche 100 µl Antiserum eingefüllt wurde. Die Diffusion erfolgte bei Raumtemperatur über Nacht.

2.16.4 Immuntitration

2.16.4.1 Immuntitration durch direkte Immunpräzipitation

Eine konstante Menge gereinigten Enzyms wurde mit unterschiedlichen Volumina des betreffenden Serums versetzt, diese Ansätze

mit TBS auf 1 ml ergänzt, und danach für 2 h bei Raumtemperatur und 17-24 h bei 4°C inkubiert. Zur Entfernung der Immunpräzipitate wurde dann 15 min in einer Microfuge (Eppendorf) zentrifugiert.

Der Überstand wurde zur Bestimmung des Serumtiters in den entsprechenden Enzymtest eingesetzt.

2.16.4.2 Immuntitration nach Sewell (116)

Zu 1 µl Antiserum wurden unterschiedliche Mengen des betreffenden Antigens zugegeben und mit TBS auf das entsprechende Volumen aufgefüllt. Der Ansatz wurde 2 h bei Raumtemperatur, dann 17-24 h bei 4°C inkubiert, danach zur Entfernung der Immunpräzipitate 15 min in der Microfuge (Eppendorf) zentrifugiert.

Es wurde wie unter 2.16.2 beschrieben eine Glasplatte mit Agarlösung beschichtet und Depots in zwei Reihen mit einem jeweiligen Abstand von 8 mm eingestantzt.

In der ersten Reihe wurden die jeweiligen Überstände nach Zentrifugation in aufsteigender Antigenkonzentration in die Depots eingefüllt.

In die zweite Reihe, deren Depots genau mitten zwischen den Depots der ersten Reihe angeordnet waren, wurden abwechselnd Antigen und Antiserum in der zuvor ausgetesteten Konzentration, die ein im Ouchterlonytest (2.16.2) in der Äquivalenz befindliches Immunpräzipitat erzeugt, eingefüllt.

Die Agarplatten wurden 24-48 h bei Raumtemperatur zur Diffusion in einer luftfeuchtigkeitsgesättigten Kammer stehen gelassen und zur anschließenden Analyse wie unter 2.16.2 getrocknet und gefärbt.

Der Antiserumtiter wurde bei der keine Deflektion der Präzipitatbande erzeugenden Antigenkonzentration bestimmt (Äquivalenzpunkt).

2.16.5 Indirekte Immunpräzipitation (117)

25 µl einer Proteinlösung mit dem betreffenden Antigen wurden mit dem gleichen Volumen Dilutionspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 10 mM L-Methionin, 1% (v/v) Nonidet P-40, 2 mM EDTA) und 5 µl Präimmunserum vermischt und 30 min bei 4°C stehengelassen. Nach Zugabe von 50 µl einer 2,9%igen (w/v) Protein A-Sepharoselösung (s.u.) wurde 30 min bei 4°C auf einem Heidolph-Mixer (REAX 2000) auf Stufe 4 geschüttelt. Anschließend wurde 1 min mit einer Microfuge (Eppendorf) zur Abtrennung der Protein A-Sepharose zentrifugiert.

Zum Oberstand wurden nun 10 µl des Antiserums (in der jeweiligen Verdünnung) zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 4°C, danach 15 min bei Raumtemperatur unter Schütteln auf dem Heidolph-Mixer. Jedem Ansatz wurde nun 100 µl Protein A-Sepharoselösung zugefügt, die Ansätze für 45 min bei Raumtemperatur geschüttelt und danach 1 min in der Microfuge zentrifugiert.

Das so erhaltene Protein A-Sepharosepellet wurde nun wie folgt mit je 1 ml Puffer gewaschen:

- a) 1 x mit Dilutionspuffer
- b) 2 x mit Waschpuffer I (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 10 mM L-Methionin, 0,05% (v/v) Nonidet P-40)
- c) 2 x mit Waschpuffer II (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 10 mM L-Methionin)
- d) 1 x mit Waschpuffer III (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 10 mM L-Methionin)

Die Ablösung der Antigen-Antikörperkomplexe zur Analyse durch SDS-PAGE erfolgte durch 5 min Kochen bei 100°C in Probenpuffer (2.10).

Dilutions- und Waschpuffer sowie alle verwendeten Gefäße wurden vor Gebrauch autoklaviert. Die Vorbehandlung der Protein A-Sepharoselösung wurde wie folgt durchgeführt:

0,1 g Protein A-Sepharose CL-4B wurden in 1 ml 10% (w/v) Saccharose und 0,5% (v/v) Nonidet P-40 quellen gelassen, 5 mal mit Dilutionspuffer gewaschen und schließlich in 3,5 ml Dilutionspuffer aufgenommen.

2.16.6 ELISA nach Western Blotting (Immunblotting) (118)

Der ELISA erfolgte nach elektrophoretischem Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose (2.12).

Zur Absättigung nicht besetzter Bindungsstellen wurde die Nitrocellulosefolie mindestens 30 min mit 5% (w/v) BSA in TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,9% NaCl) mit 0,1% (v/v) Tween 20 und 0,02% (w/v) Natriumazid versetzt. Die Folie wurde dann zweimal mit TBS mit 0,1% (v/v) Tween 20 gewaschen und 1 h mit dem entsprechenden Antiserum in einer geeigneten Verdünnung in TBS/0,1% (v/v) Tween 20 inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit TBS/Tween 20 wurde Goat-anti-Rabbit IgG (peroxidasekonjugiert) in einer Verdünnung von 1:10.000 in TBS/Tween 20 zugegeben und für 1 h mit der Folie inkubiert. Danach wurde wieder fünfmal mit TBS/Tween 20 und schließlich fünfmal mit TBS zur Entfernung des Detergens gewaschen.

Zur Immunodetektion wurde der Folie eine Lösung von 45 mg 4-Chloro-1-Naphthol in 15 ml Methanol und 75 ml TBS zugegeben. Die Peroxidasereaktion wurde durch Zugabe von 30 μ l H_2O_2 (30%ig) gestartet und nach maximal 15 min durch Spülen der Folie mit Wasser beendet.

Alle Vorgänge wurden bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln durchgeführt und beziehen sich, soweit nicht anders angegeben, auf ein Volumen von 100 ml.

2.16.7 Affinitätsreinigung von Antikörpern aus heterogenen Proben

Eine Proteinprobe, die das entsprechende Antigen enthielt, wurde SDS-Gelelektrophorese unterworfen (2.10) und unmittelbar anschließend elektrophoretisch auf Nitrocellulose transferiert (2.12). Während ein Teil der Folie nach Beendigung des Blottings mit Amidoschwarzlösung angefärbt wurde und als Markerstreifen diente, wurde die restliche Folie zur Absättigung freier Bindungsstellen mit 5% (w/v) BSA in TBS mit 0,1% (v/v) Tween 20 behandelt.

Nach fünfmaligem Waschen in TBS mit Tween wurde die Folie für

1 h in 100 ml 1:50 in dem gleichen Puffer verdünntem Antiserum inkubiert, danach wie zuvor fünfmal gewaschen, zuletzt zweimal mit TBS ohne Detergenszusatz.

Mit Hilfe des Markerstreifens wurde nun der dem Protein entsprechende Bereich mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Elution der an den Proteinen gebundenen Antikörper erfolgte in 10 ml eiskaltem 0,2 M Glycin-HCl, pH 2,8, für 2 min unter konstantem Schütteln (119). Nach Entfernen der Nitrocellulosestreifen wurde das Eluat anschließend sofort mit 0,52 ml 1 M Tris auf pH 7,4 gebracht.

Diese Antikörperfraktion wurde nach Zugabe von 10 ml TBS mit 0,1% (v/v) Tween 20 in einem folgenden Immunblot eingesetzt. Sämtliche Schritte wurden, soweit nicht anders gekennzeichnet, bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.17 Isolierung und Reinigung von mRNA

2.17.1 Isolierung von total-RNA (120,121)

10 g frisch geerntetes Myzel wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einem auf Trockeneis gekühlten Mörser für ca. 50 min pulverisiert. Nach Auftauenlassen des Pulvers auf ca. 4°C wurden 50 ml RNA-Aufschlußpuffer (50 mM Tricin-HCl, pH 9,2, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 5% (w/v) SDS, 1% (v/v) 2-Mercaptoethanol) zugesetzt und in einem GSA-Zentrifugenbecher für 2 min gemixt. Danach wurden 50 ml PCI (Phenol/Choroform/Isoamylalkohol (25:25:1), gesättigt in RNA-Aufschlußpuffer) zugegeben und 1 min gemixt. Zur Phasentrennung folgte eine Zentrifugation bei 4000 g für 15 min bei 10°C im GSA-Rotor der Sorvall-Zentrifuge RC-2B. Die obere wäßrige Phase wurde abgenommen, die untere organische Phase wurde zwecks Reextraktion erneut mit 30 ml RNA-Aufschlußpuffer gemischt. Die vereinigten wäßrigen Phasen wurden nun solange mit PCI extrahiert, bis keine weiße Interphase, hauptsächlich aus denaturiertem Protein bestehend, mehr sichtbar war (meistens 5 mal). Die wäßrige Phase wurde mit 3 M Natriumacetatlösung, pH 6,0, auf 0,3 M Na⁺ eingestellt, und durch Zugabe von 2 Volumenteilen Ethanol

wurde die RNA bei -20°C über Nacht ausgefällt. Das Präzipitat wurde bei 0°C mit 10.000 g abzentrifugiert und in wenig 150 mM Natriumacetatpuffer, pH 6,0, zur CsCl-Gradientenzentrifugation in Lösung gebracht.

2.17.2 Cäsiumchlorid-Gradientenzentrifugation (122)

Zur Abtrennung von DNA wurde die total-RNA-Präparation mit einer 0,4 g/ml CsCl-Lösung in 150 mM Natriumacetatpuffer, pH 6,0, gemischt und auf 6 Zentrifugenröhrchen mit je 12,5 ml verteilt. Nach Unterschichten mit 2 ml einer 1 g/ml CsCl-Lösung erfolgte eine Ultrazentrifugation in einer Sorvall OTD65 Ultrazentrifuge bei 20°C und 21.000 rpm für 16 h. Der DNA enthaltende Oberstand wurde dekantiert, die Pellets schließlich in TES-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 5 mM EDTA, 0,1% (w/v) SDS) gelöst. Nach Einstellung auf 0,3 M Natriumacetat und Zugabe von 2 Volumenteilen Ethanol erfolgte eine Fällung bei -80°C . Die RNA-Pellets wurden nach Abzentrifugieren im HB 4-Rotor der Sorvall RC 2B bei 0°C mit 10.000 rpm mit 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen, im Exsikkator getrocknet und in 2 ml Aqua bidest. aufgenommen.

2.17.3 Isolierung von poly A-RNA durch Chromatographie an Oligo-dT-Cellulose (123)

Die Oligo-dT-Cellulose (Typ 7, Pharmacia) wurde entsprechend den Angaben des Herstellers vorbehandelt, in eine kleine Säule (Bettvolumen 2 ml) gefüllt und mit Bindungspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,5 M KCl, 1 mM EDTA) äquilibriert. Die aufzutragende RNA wurde mit dem gleichen Volumenteil doppelt konzentriertem Bindungspuffer versetzt und unter Schließen des Säulenkreislaufs wiederholt auf die Oligo-dT-Säule aufgetragen, um die an die Matrix gebundene poly A-RNA-Menge zu maximieren (ca. 3 h bei einer Durchflußrate von 25 ml/h).

Anschließend wurde mit Waschpuffer (10 mM Tris HCl, pH 7,4, 0,15 M KCl, 1 mM EDTA) gespült (1,5 h). Die Ablösung der

poly-A-RNA erfolgte durch Elution mit 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, bei 55°C. Die aufgefangenen Fraktionen wurden mit Ethanol gefällt, in 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet, und in bidestilliertem Wasser aufgenommen. Die RNA wurde bei -70°C aufbewahrt.

2.17.4 Gehaltsbestimmung und Qualitätskontrolle der RNA (124)

RNA-Konzentrationen wurden spektrometrisch im Zeiss Spektralphotometer PMQ II bestimmt: 1 optische Einheit (E_{260}) = 45 µg/ml RNA. Zur qualitativen Überprüfung wurde die Extinktion bei 260 nm und 280 nm gemessen. Der Quotient aus E_{260}/E_{280} näherte sich mit abnehmender Verunreinigung der RNA einem Wert von 2,0.

2.18 In vitro Translation (120)

Die in vitro Translation wurde mit dem Translation Kit (New England Nuclear) durchgeführt, dem nukleasebehandeltes Retikulozytenlysat aus Kaninchen beigefügt war. Das Translation Kit wurde bei -70°C aufbewahrt.

Die Translationen erfolgten in 25 µl Ansätzen in Eppendorf-Reaktionsgefäßen. In jeden Ansatz wurden 5,5 µl Cocktail, 2,0 µl 1 M Kaliumacetat, 0,5 µl 32,5 mM Magnesiumacetat, 50 µCi L-[³⁵S]-Methionin und das entsprechende Volumen bidestilliertes Wasser pipettiert.

Die in vitro Translation wurde durch Zugabe von 1 µg RNA pro 25 µl Ansatz gestartet und für 1 h bei 37°C inkubiert.

Durch Zugabe von 1 µg RNase A, Inkubation 5 min bei 37°C und sofortiges Abkühlen auf Eis wurden die Reaktionen gestoppt.

Zur Analyse über SDS-PAGE wurden 5 µl dieses Ansatzes in 30 µl Probenpuffer (2.10) für 5 min bei 100°C denaturiert.

Zur Kontrolle des Vorhandenseins endogener mRNA im Retikulozytenlysat wurden Kontrollversuche ohne Zugabe von RNA durchgeführt.

2.19 pH-Messungen

Die Bestimmung des pH-Wertes von Puffern und anderen Lösungen erfolgte mit einem Knick Mikroprozessor-pH-Meter 743.

2.20 Leitfähigkeitsmessungen

Die Leitfähigkeit von kaliumchlorid- oder kaliumphosphat-haltigen Lösungen und Fraktionen nach Säulenchromatographie erfolgte mit dem Conductivity Meter CDM 3 der Firma Radiometer, Kopenhagen.

2.21 Proteinbestimmungen

Proteinbestimmungen wurden nach der Methode von Bradford (125) durchgeführt. Die Auswertung nach Eichgeraden erfolgte mit Rindergammaglobulin als Standardprotein.

2.22 Enzymbestimmungen

Die photometrischen Bestimmungen von Enzymaktivitäten wurden am Spektralphotometer Zeiss PMQ II bzw. Perkin-Elmer 555 durchgeführt.

Als Einheit für die Enzymaktivität wurde die SI-Einheit Katal gewählt. 1 Katal (kat) bewirkt einen Stoffumsatz von 1 mol pro Sekunde unter definierten Bedingungen.

Acyl-CoA Dehydrogenase (Acyl-CoA: Acceptor Oxidoreduktase) (EC 4.2.1.17) (126)

0,2 M Bicin, pH 8,0, 0,15% (v/v) Triton X-100

0,25 mM Iodonitrotetrazoliumchlorid

0,1 mM Meldolablauf

10-50 µl Enzymlösung

0,1 mM Acyl-CoA

492 nm; 30°C; 19,4 cm²/µMol

Enoyl-CoA Hydratase (3-Hydroxyacyl-CoA Hydrolase)
(EC 4.2.1.17) (91)

50 mM Tris-HCl, pH 9,0, 50 mM KCl, 50 µg/ml BSA
1 mM NAD
10 µg/ml 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase (Boehringer Mannheim)
2-50 µl Enzymlösung
0,1 mM 2-trans-Decenoyl-CoA
340 nm; 30°C; 6,22 cm²/µMol

3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase (L-3-Hydroxyacyl-CoA:
NAD Oxidoreduktase) (EC 1.1.1.35) (91)

50 mM Tris-HCl, pH 9,0, 50 mM KCl, 50 µg/ml BSA
1 mM NAD
25 µg/ml Enoyl-CoA Hydratase (aus Rinderleber, 44 U/mg, 1:100)
2-50 µl Enzymlösung
0,1 mM 2-trans-Decenoyl-CoA
340 nm; 30°C; 6,22 cm²/µMol

3-Hydroxyacyl-CoA Epimerase (EC 5.1.2.3) / 3-Oxoacyl-CoA
Thiolase (Acetyl-CoA Acyltransferase) (EC 2.3.1.16);
gekoppelter Test (127,128)

50 mM Tris-HCl, pH 9,0, 50 mM KCl, 50 µg/ml BSA
25 mM MgCl₂
1 mM Natriumpyruvat
1 mM NAD
10 µg/ml 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase (Boehringer Mannheim)
µ0 mg/ml Lactatdehydrogenase (Boehringer Mannheim)
50 µM DL-3-Hydroxydecanoyl-CoA
2-50 µl Enzymlösung
0,5 mM Coenzym A
303 nm; 30°C; 13,9 cm²/µMol

3-cis,2-trans-Enoyl-CoA Isomerase (EC 5.3.3.7) (91)

50 mM Tris-HCl, pH 9,0, 50 mM KCl, 50 µg/ml BSA
1 mM NAD
10 µg/ml 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase (Boehringer Mannheim)
25 µg/ml Enoyl-CoA Hydratase (aus Rinderleber, 44 U/mg, 1:100)
2-50 µl Enzymlösung
0,1 mM 3-trans-Decenoyl-CoA
340 nm; 30°C; 6,22 cm²/µMol

Isocitratlyase (EC 4.1.3.1) (129)

50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4
5 mM Phenylhydrazinhydrochlorid
5 mM $MgCl_2$
2 mM DTE
6,25 mM DL-Isocitrat
10-50 μ l Enzymlösung
324 nm; 25°C, 17 cm^2/μ Mol

Katalase (EC 1.11.1.6) (130)

50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4
10 mM H_2O_2
5-50 μ l Enzymlösung
240 nm; 25°C, 0,036 cm^2/μ Mol

Fumarase (EC 4.2.1.2) (131)

50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4
4 mM L-Malat
10-50 μ l Enzymlösung
240 nm; 25°C, 2,44 cm^2/μ Mol

Das Volumen der enzymatischen Testansätze betrug jeweils 1 ml. Die Durchführung der Tests erfolgte in reduzierten Küvetten.

2.23 Aminosäureanalysen

2.23.1 Bestimmung der Aminosäurekomposition

Die quantitative Bestimmung der Aminosäurekomposition wurde mit der PTC-Derivatisierungsmethode (132,133) durchgeführt. Die Proteinprobe wurde zunächst zur Beseitigung störender Puffer- und Salzanteile einem präparativen HPCL-Lauf unterzogen. Hierzu diente eine 5 μ m Vydac C4-Säule (4,6 x 180 mm), an welche ein Gradient von 0,1% Trifluoressigsäure gegen 84% Acetonitril, 0,08% Trifluoressigsäure mit einer Durchflußrate von 1 ml/min bei 40°C angelegt wurde.

Die fraktioniert aufgefangene Probe wurde lypophilisiert, in 100 μ l 50%iger Ameisensäure aufgenommen und auf 9 Hydro-

lyseröhrchen (je 10 µl) verteilt. Zur Hydrolyse wurden jeweils 300 µl 6M HCl und ein Phenolkristall zugegeben. Die Proben wurden mit Stickstoff begast und bei 110°C im Trockenschrank hydrolysiert. Jeweils drei Proben wurden nach 24 h, 48 h bzw. 72 h auf Raumtemperatur gebracht. Die Gefäße wurden schließlich zur Entfernung der überschüssigen Salzsäure an eine Vakuumapparatur angeschlossen, dann erneut mit Stickstoff begast.

Die Proben wurden zweimal mit je 20 µl eines Alkalisierungsgemisches (Ethanol/Triethanolamin/H₂O 2:2:1) gewaschen und zur Trockne eingedampft, in je 10 µl Lösungsgemisch (Ethanol/Triethanolamin/H₂O 7:1:1) angelöst, mit Stickstoff begast und dann mit 10 µl (je Gefäß) Kopplungsreagenz (Ethanol/Triethanolamin/H₂O/PITC 7:1:1:1) versetzt. Nach 5 min Inkubation bei 50°C wurde unter Lichtausschluß bis zur Trockne eingedampft, der Rückstand in 50 µl HPLC-Startpuffer (25 mM Ammoniumacetat, pH 6,8) aufgenommen, wovon jeweils 20 µl in ein HPLC-System injiziert wurden, welches eine 3 µm Reversed Phase 18 Spherisorb OD sII-Säule auf Kieselgelbasis, Pumpen und Steuersystem von Kontron und einen UV-Detektor Spectroflow 773 von Kratos (260 nm) umfaßte. Nach dem Auftrag der Proben wurde ein Gradient von 25 mM Ammoniumacetat, pH 6,8, gegen 80 mM Ammoniumacetat, pH 6,8, 44% Acetonitril und 10% Methanol angelegt.

Die Identifizierung der einzelnen Aminosäuren erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten mit einem Standard (PTC-derivatisiertes Aminosäuregemisch) bekannter Zusammensetzung und Konzentration, die Konzentrationsbestimmung durch Integration der Peaks. Die Auswertung der einzelnen Aminosäuren erfolgte, soweit erforderlich, durch Extrapolation, indem die gefundenen Meßwerte in Mol-Prozent in einem Diagramm gegen die Hydrolysezeiten eingezeichnet wurden.

Tryptophan und Cystein sind mit dieser Methode nicht nachweisbar.

2.23.2 Aminoterminaler Sequenzanalyse

Zur aminoterminalen Sequenzanalyse wurden Proben eingesetzt, die zuvor über reverse-phase HPLC an einer Vydac C₁₈-Säule (4,0 x 150 mm) 218 TP 514 bzw. Vydac C₄-Säule (4,6 x 180 mm) 5 µm aufgetrennt wurden oder durch Elektroelution mit anschließender Elektrodialyse (2.13) aus Gelbanden nach SDS-PAGE isoliert wurden.

Zum automatischen sequentiellen Edman-Abbau wurde ein Applied Biosystems Gasphasensequenator benutzt, der mit einem on-line PTH-Aminosäureanalyzer mit einem 03 RPTH-Programm ausgestattet war.

3. E R G E B N I S S E

3.1 Wachstum und Induktion der β -Oxidation von Neurospora crassa

Mit dem Ziel, Enzyme der β -Oxidation isolieren zu können, wurden geeignete Anzuchtbedingungen gesucht, die einerseits eine hohe Zellausbeute ergaben, andererseits aber auch die Aktivitäten der β -Oxidationsenzyme induzierten.

In früheren Versuchen von Kionka und Kunau (103) wurde das Ausmaß der Induktion der β -Oxidation im Vergleich zwischen Zellen von N.crassa, die auf 2% (w/v) Saccharose, 40 mM Acetat oder 1 mM Ölsäure als einziger Kohlenstoffquelle gewachsen waren, gezeigt. Zwar erfolgte die größte Induktion der Enzymaktivitäten in ölsäuregewachsenen Zellen, jedoch war die Ausbeute an Myzel sehr niedrig im Vergleich zu Zellen, die auf 2% (w/v) Saccharose gewachsen waren.

Acetatgewachsene Hyphen dagegen zeigten sowohl eine relativ ausgeprägte Induktion der β -Oxidation (durchschnittlich 4fach im Vergleich zu saccharosegewachsenen Zellen mit Ausnahme der Enoyl-CoA Hydratase mit einem Induktionsfaktor von 1,4), ausserdem auch ein gutes Wachstum in Medien mit dieser Kohlenstoffquelle. Um hohe Zellausbeuten in Verbindung mit möglichst großen Enzymaktivitäten der β -Oxidation zu erhalten, wurden Anzuchtbedingungen gewählt, die die Vorteile von Acetat- und Ölsäureinduktion durch Wachstum auf Medien unter Zusatz beider Kohlenstoffquellen gemeinsam miteinander verknüpften.

N.crassa wurde 48 h in einer Vorkultur mit 40 mM Natriumacetat wachsen gelassen und anschließend in 10 l eines Mediums mit 40 mM Natriumacetat, 1 mM Ölsäure und 1% (w/v) Tergitol NP 40 als Detergens zur Emulgierung der Ölsäure überführt.

Tabelle 1 zeigt eine Aufstellung der gefundenen Werte für die gemessenen Enzymaktivitäten in den jeweiligen Rohextrakten im Vergleich zur Menge des geernteten Myzels zu den angegebenen Zeiten. Es wurde die tabellarische Form der Präsentation gewählt, weil sie vergleichend die Werte der Enzymaktivitäten, bezogen auf die Menge Protein in den Rohextrakten (spezifische

Tabelle 1: Wachstum von *N. crassa*-Hyphen und Induktion verschiedener Enzymaktivitäten in einem Medium mit 40 mM Natriumacetat, 1 mM Ülsäure und 1% (w/v) Tergitol NP 40 als Kohlenstoffquelle¹

t	FG ² [g]	Protein [mg/ml]		Acyl-CoA DH		Enoyl-CoA Hydratase		3-Hydroxyacyl-CoA DH		3-Oxoacyl-CoA Thiolase		Isocitratlyase		Katalase		Fumarase	
		gkat	gtotal	gkat	gtotal	gkat	gtotal	gkat	gtotal	gkat	gtotal	gkat	gtotal	gkat	gtotal	gkat	gtotal
0 h	2,2	6,43	3,50	0,01	0,10	0,11	0,24	1,65	0,04	0,09	0,65	0,10	0,22	1,50	0,34	0,75	5,32
4 h	4,8	7,58	21,50	0,10	0,50	0,08	0,38	2,10	0,05	0,24	1,30	0,20	0,96	5,33	0,21	1,01	5,55
8 h	6,6	5,12	36,34	0,24	0,83	0,12	0,80	2,98	0,09	0,60	2,17	0,28	1,84	6,83	0,17	1,11	4,13
12 h	13,8	8,87	51,51	0,72	1,17	0,21	2,90	5,77	0,10	1,35	2,22	0,85	11,72	19,17	0,20	2,82	4,62
16 h	24,8	9,81	39,34	0,98	1,17	0,28	6,94	6,40	0,08	1,89	2,12	0,51	12,72	14,34	0,20	4,93	5,52
20 h	44,0	14,64	36,84	1,62	0,83	0,24	10,67	5,40	0,10	4,34	2,20	0,64	28,33	14,34	0,25	11,02	5,57
24 h	61,2	12,39	39,17	2,40	1,00	0,31	18,82	7,63	0,10	6,35	2,57	0,49	29,82	12,17	0,20	12,17	4,93
28 h	71,5	12,87	29,34	2,10	0,67	0,22	16,07	5,12	0,09	6,36	2,03	0,44	31,66	10,17	0,23	16,72	5,33
32 h	80,6	10,53	38,34	3,09	1,17	0,17	14,03	5,18	0,08	6,22	2,33	0,37	29,74	11,00	0,18	14,52	5,38
48 h	81,4	9,4	13,84	1,13	0,67	0,07	6,01	3,43	0,04	3,62	2,07	0,14	11,17	6,33	0,08	6,76	3,87

¹ Die Zellen wurden für 48 h in 1 l eines Mediums mit 40 mM Natriumacetat wachsen gelassen und in das oben genannte Medium (10 l) überführt. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Myzelien geerntet und aufgeschossen. Die Messung der Enzymaktivitäten erfolgte in den Rohextrakten.

² Feuchtgewicht

Enzymaktivität), gegenüber den Gesamtenzymaktivitäten, bezogen auf das Feuchtgewicht des jeweils geernteten Myzels, zeigen kann.

Für die Reinigung der β -Oxidationsenzyme besonders günstig wurde eine Ernte nach 24 h Wachstum angesehen, weil die Zellen in ihre spätlogarithmische Wachstumsphase eintreten, und die entsprechenden Werte für das Verhältnis der Enzymaktivitäten pro g Myzelfeuchtgewicht jeweils sehr hoch lagen. Die β -Oxidationsenzyme wiesen hier im Vergleich zum Zeitpunkt des Beimpfens der Hauptkulturen einen 4- bis 10fachen Induktionsfaktor auf, während die Fumarase als mitochondriales Leitenzym sowie die Isocitratlyase als am Glyoxylatzyklus beteiligtes Enzym annähernd unveränderte Werte aufwiesen. Letzteres erklärt sich wohl aus der Tatsache, daß die Aktivitäten der Isocitratlyase auf Acetat wie auf Ölsäure einen etwa gleich großen Induktionsfaktor aufweisen (ca. 30fach), der Glyoxylat-"bypass"-Stoffwechselweg anscheinend einer anderen Kontrolle unterlegen ist als der Fettsäureabbau (103). Die Katalase zeigte im Verlauf des Wachstums der Zellen unter diesen Bedingungen nicht induzierte Enzymaktivitäten.

Die gezeigten Werte korrelieren gut mit den von Kionka und Kunau (103) angegebenen Induktionsfaktoren, berücksichtigt man den Unterschied, daß die Hyphen hier zunächst in einem acetathaltigen Medium gewachsen sind, und die Anzucht in wesentlich größeren Kulturgefäßen erfolgte.

3.2 Proteinreinigungen

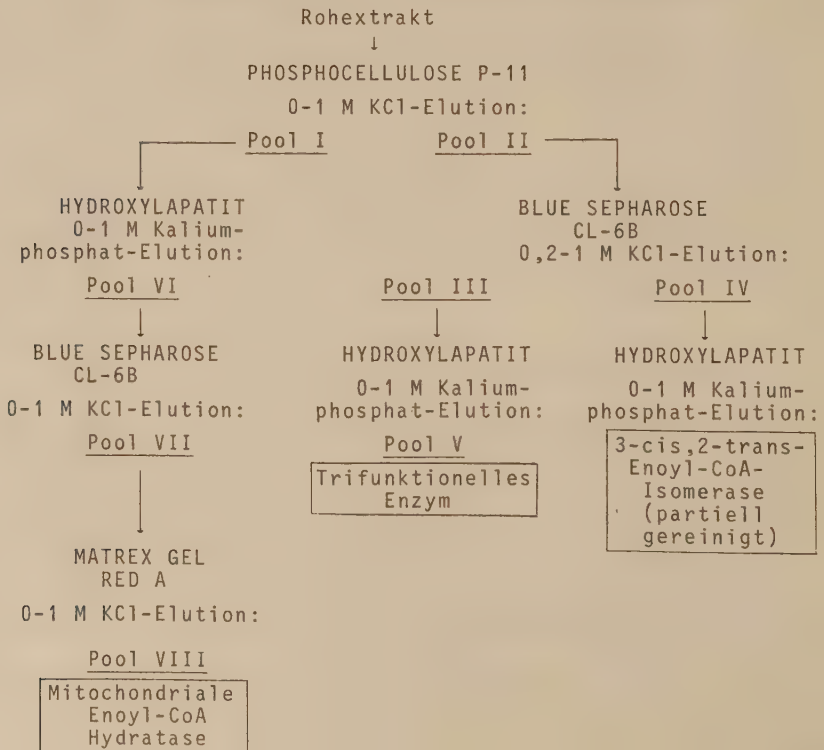
Als Ausgangsmaterial für die Proteinreinigungen diente jeweils ein Rohextrakt, der unmittelbar vor dem Auftrag auf die erste Säule frisch zubereitet wurde. Hierzu wurde tiefgefrorenes N.crassa Myzel, das nach 24 h Wachstum auf 40 mM Natriumacetat, 1 mM Ölsäure mit 1% (w/v) Tergitol NP 40 als Kohlenstoffquellen (2.5) geerntet wurde, im Bead-Beater aufgeschlossen und durch nachfolgende Zentrifugation von Zellbruchstücken befreit.

Der so in einem 50 mM Tris-Puffer, pH 7,4 (Puffer A, s. 2.6.1),

vorliegende Extrakt wurde zur Säulenchromatographie an Phosphocellulose eingesetzt. Ziel der Proteinreinigung war die Abtrennung der Aktivitäten der Enoyl-CoA Hydratase und 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase von Fremdprotein und die Reinigung zur Homogenität. Besondere Berücksichtigung fand hierbei auch zusätzlich die Messung von 3-Hydroxyacyl-CoA Epimerase- und der 3-cis,2-trans-Enoyl-CoA Isomerase-Aktivitäten, um zu untersuchen, ob die Enzymaktivitäten der 2. und 3. Reaktion der β -Oxidation eventuell unter Beteiligung von Enzymaktivitäten aus dem Abbau ungesättigter Fettsäuren zu einem multifunktionellen Protein verankert sind.

Zur besseren Übersichtlichkeit wird nachfolgend ein vereinfachtes Schema der einzelnen Reinigungsschritte gezeigt, mit der auch später in den Tabellen und Abbildungen gewählten Kennzeichnung der Pools der einzelnen säulenchromatographischen Schritte:

Schematische Übersicht über die Reinigungen



3.2.1 Kationenaustauschchromatographie eines Rohextraktes an Phosphocellulose P-11

Durch Auftrag eines Rohextraktes auf eine Phosphocellulosesäule konnten alle an der β -Oxidation beteiligten Enzymaktivitäten sowie 3-Hydroxyacyl-CoA Epimerase und 3-cis,2-trans-Enoyl-CoA Isomerase gebunden und mittels eines linearen Gradienten von 0-1 M KCl wieder eluiert werden.

Die Bindung der Enzyme aus dem Rohextrakt erfolgte bei pH 7,4, so daß Proteine, die bei neutralem pH eine positive Gesamtladung aufweisen, an die Gelmatrix binden. Das gilt somit hauptsächlich für basische Proteine, deren isoelektrischer Punkt höher als pH 7,4 liegt.

Abbildung 1 gibt einen Aufschluß über die Verteilung der Enzymaktivitäten im KCl-Gradienten. 3-Oxoacyl-CoA Thiolase und Acyl-CoA Dehydrogenase I (nicht miteingezeichnet) konnten bei einer Leitfähigkeit von 8,5 mS bzw. 9,5 mS von der Säule abgelöst werden (134) und zeigten demzufolge ein deutlich anderes Bindungsverhalten an der Phosphocellulosesäule als die übrigen gemessenen Enzymaktivitäten. Die Enoyl-CoA-Hydrataseaktivität verteilte sich auf zwei deutlich voneinander getrennte Peaks über den Gradienten. Der erste Peak (auch mit einem Querbalken mit I gekennzeichnet) konnte bei einer durchschnittlichen Leitfähigkeit von 11 mS, entsprechend einer Salzkonzentration von 0,14 M KCl, gemessen werden, das Aktivitätsvolumen des zweiten Peaks bei einer weitaus größeren Leitfähigkeit von 25 mS (0,28 M KCl).

Die Auftrennung eines Rohextraktes durch Kationenaustauschchromatographie ergibt somit erste Hinweise auf die Existenz von zwei molekular verschiedenen Enzymen mit Enoyl-CoA Hydratase-Aktivität.

Bei der gleichen Ionenstärke und mit annähernd identischem Elutionsprofil wie der zweite Hydratase-Peak konnten 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase, Epimerase und Isomerase gemessen werden. Zur weiteren Reinigung dieser Enzymaktivitäten wurden entsprechende Fraktionen gepoolt (Pool II) und wie unter 3.2.2.1 beschrieben weiterbehandelt.

Alle hier gemessenen Enzymaktivitäten konnten zu ca. 90% im Gradienten der P-11 wiedergefunden werden. Im Durchlauf des Auftrags dagegen ließen sich weniger als 5% der Aktivitäten, bezogen auf den Gesamtauftrag, bestimmen. Die Möglichkeit des Vorhandenseins weiterer Proteine mit den erwähnten Enzymaktivitäten ist demnach als relativ unwahrscheinlich einzustufen. Lediglich die Isomerase konnte nur zu 10% im Eluat nachgewiesen werden; im Durchlauf jedoch war annähernd gar keine Aktivität meßbar, was auf eine besondere Instabilität der Isomerase unter diesen Versuchsbedingungen hinweist.

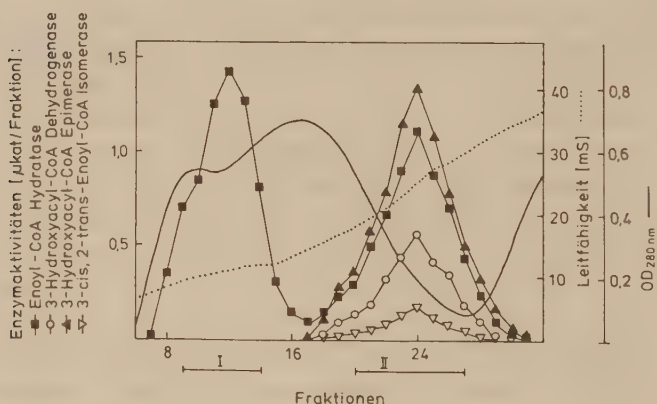


Abb. 1: Kationenaustauschchromatographie an Phosphocellulose P-11

Die Abbildung zeigt die Auftrennung der in der Grafik erläuterten Enzymaktivitäten durch einen 0 - 1M KCl-Gradienten nach Auftrag von 300 ml Rohextrakt.

Die beiden Balken unter den Fraktionsnummern zeigen die Pools (I und II) an, mit denen zur weiteren Proteinreinigung gearbeitet wurde.

3.2.2 Reinigung des Trifunktionellen Enzyms

Wie durch die nachfolgend beschriebenen Reinigungs- und Charakterisierungsversuche verdeutlicht wird, konnte aus N.crassa ein multifunktionelles Protein isoliert werden, auf welchem drei Enzymaktivitäten lokalisiert sind. Dieses Protein wird in den weiteren Ausführungen daher als Trifunktionelles Protein (TFE) bezeichnet.

Zur Reinigung des TFE, welches die Aktivitäten 2-Enoyl-CoA Hydratase, L-3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase und Epimerase trägt, wurde mit dem Pool II des P-11-Eluates weitergearbeitet.

Besondere Berücksichtigung bei der weiteren Reinigung fand hierbei die Messung der 3-cis,2-trans-Enoyl-CoA Isomeraseaktivität, weil diese mit der gleichen Ionenstärke in dem KCl-Gradienten der P-11 abgelöst werden konnte, und die Möglichkeit einer molekularen Verankerung mit dem TFE untersucht werden sollte.

3.2.2.1 Trennung der 3-cis,2-trans-Enoyl-CoA Isomerase vom Trifunktionellen Enzym durch "dye-ligand"-Chromatographie an Blue Sepharose CL-6B

Um sicherzustellen, daß eine Bindung der Enzyme an das Farbstoffgel erfolgendes konnte, wurde der Pool II des P-11-Gradienten zunächst durch Verdünnung mit Puffer A (s. 2.6.1) auf eine Leitfähigkeit des Auftrags von 15 mS (0,18 M KCl) herabgesetzt.

Die Säule wurde danach mit Puffer A unter Zusatz von 200 mM KCl gespült. Unter diesen Bedingungen wurde ein Großteil der bis zu dieser Ionenstärke bindenden Proteine herausgespült (vgl. 2.9.2, Methode A). Anschließend wurde mit einem 0,2 - 1 M KCl-Gradienten eluiert.

Abbildung 2 zeigt die Verteilung der gemessenen Enzymaktivitäten auf die Fraktionen des aufgefangenen Eluats.

Enoyl-CoA Hydratase, 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase und Epimerase konnten mit dem gleichen Elutionsprofil bei einer Ionen-

Keine der Aktivitäten des Auftrags aus Pool II konnte jedoch durch biospezifische Elution mit NAD von den Farbstoffgelen gelöst werden, obwohl mit der 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase ein NAD-abhängiges Protein untersucht wurde (Daten werden nicht gezeigt). Das läßt wiederum vermuten, daß die Bindung an den Farbstoff bevorzugt nicht über die Nukleotid-Bindungsstelle erfolgt.

Zur weiteren Reinigung wurden die Fraktionen entsprechend zu Pools vereinigt (Pool III und IV), wobei auf Randfraktionen verzichtet wurde, um die Verunreinigungen möglichst gering zu halten.

3.2.2.2 Adsorption an Hydroxylapatit

Den letzten Reinigungsschritt des Trifunktionellen Enzyms stellte die Adsorptionschromatographie an Hydroxylapatit (Ultrogel LKB) dar. Hierzu wurde Pool III aus den Gradientenfraktionen der Blue Sepharose CL-6B direkt auf eine zuvor in einem 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4 (Puffer D, s. 2.9.5), äquilibrierte Säule aufgetragen und mit einem linearen 50-1000 mM Phosphatgradienten eluiert.

Auch hier erfolgte eine gleichzeitige Ablösung der Aktivitäten von Enoyl-CoA Hydratase, 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase und Epimerase mit identischem Elutionsprofil. Das Aktivitätsmaximum lag hier bei einer 0,15 M Phosphatkonzentration.

Nahezu 100% der aufgetragenen Enzymaktivitäten konnten im Eluat der Säule wiedergefunden werden.

Nach dem Bewertungskriterium von SDS-PAGE lag nach diesem letzten Reinigungsschritt eine von allen Verunreinigungen befreite, homogene Proteinlösung vor (s. 3.2.2.3).

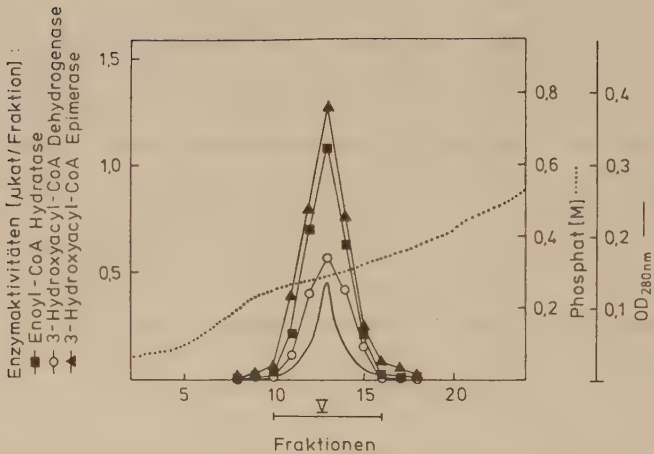


Abb. 3: Adsorptionschromatographie an Hydroxylapatit

Als Ausgangsmaterial diente Pool III aus dem Eluat der Blue Sepharose CL-6B. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 50-1000 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4.

Die zu einem Pool vereinigten Fraktionen werden durch V angezeigt.

3.2.2.3 Zusammenfassung der Reinigung des Trifunktionellen Enzyms

Die Reinigung des Trifunktionellen Enzyms aus N.crassa (TFE) konnte durch drei Reinigungsschritte erreicht werden:

1. Säulenchromatographische Auftrennung eines Rohextraktes an Phosphocellulose P-11 (3.2.1),
2. "Dye-ligand"-Chromatographie an Blue-Sepharose CL-6B (3.2.2.1) und
3. Adsorptionschromatographie an Hydroxylapatit (3.2.2.2).

Bei allen Reinigungsschritten wurden identische Elutionsprofile für die Enzymaktivitäten Enoyl-CoA Hydratase, 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase und Epimerase erhalten, wenn man von der Auftrennung auf der Phosphocellulosesäule in zwei Hydra-

tase-Peaks, denen jeweils ein molekular unabhängiges Protein zuzuordnen ist, absieht.

Tabelle 2 gibt Auskunft über das Reinigungsverhalten der einzelnen Enzymaktivitäten des TFE.

Die berechneten Ausbeuten betrugen 24-29% bezogen auf die jeweiligen Ausgangsaktivitäten im Rohextrakt bis zum letzten Reinigungsschritt. Es wurde hierbei eine 311- bis 355-fache Anreicherung erzielt.

Den quantitativ effektivsten Reinigungsschritt stellte die Ionenaustauschchromatographie an Phosphocellulose mit einer 50- bis 57-fachen Anreicherung des Proteins dar.

Außerdem wird in Tabelle 2 eine Aufstellung über das Verhältnis der Enzymaktivitäten zueinander, jeweils bezogen auf die Hydrataseaktivität, gezeigt. Vom Eluat der Phosphocellulose an bis zum Pool V der Hydroxylapatitsäule findet man ein relativ konstantes Verhältnis der Aktivitäten vor (Standardabweichungen: A_1/A_2 0,04 - A_1/A_3 0,03). Lediglich im Rohextrakt besitzen die Verhältnisse höhere Werte, was auf die gleichzeitige Anwesenheit von zwei Enzymen mit Enoyl-CoA Hydrataseaktivität zurückzuführen ist, die bei Messungen im Rohextrakt unter den durchgeführten Meßbedingungen natürlich gleichzeitig erfaßt wurden. Es fällt jedoch auf, daß die Werte sich nicht um den Betrag voneinander unterscheiden, der sich nach der Auftrennung in zwei Hydratasepeaks etwa gleich großer Aktivität im Eluat der P-11 erwarten ließ.

Der Grund hierfür könnte darin liegen, daß die Enoyl-CoA Hydrataseaktivität in Rohextrakten äußerst hoch war, was die Auswertung von Enzymkinetiken erschwerte, andererseits bzw. zusätzlich der Enoyl-CoA Hydratase-Test in Anwesenheit so hoher Enzymaktivitäten unterhalb der Substratsättigung durchgeführt wird (s. 3.3.5). Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre, daß die Löslichkeit bzw. Verfügbarkeit des Substrates im Enzymtest z.B. durch die Anwesenheit von Lipiden im Rohextrakt beeinflusst wird.

Abbildung 4 zeigt die gelelektrophoretische Analyse der einzelnen Reinigungsschritte durch SDS-PAGE. Nach der letzten

Tabelle 2: Reinigungstabelle für das Trifunktionelle Enzym aus Neurospora crassa

70 g Myzel, auf 40 mM Natriumacetat und 1 mM Ölsäure als Kohlenstoffquelle gewachsen, war das Ausgangsmaterial für eine typische Reinigung.

Fraktion	Gesamt- protein	Enoyl-CoA Hydratase				3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase				3-Hydroxyacyl-CoA Epimerase				Verhältnis der Enzymaktivitäten	
		Aktivität		Aus- beute	Anrei- cherung	Aktivität		Aus- beute	Anrei- cherung	Aktivität		Aus- beute	Anrei- cherung		
		Gesamt - spez. (A ₁)				Gesamt - spez. (A ₂)				Gesamt - spez. (A ₃)					
		mg	nkat	$\frac{\text{nkat}}{\text{mg}}$	%	-fach	nkat	$\frac{\text{nkat}}{\text{mg}}$	%	-fach	nkat	$\frac{\text{nkat}}{\text{mg}}$	%	-fach	
Rohextrakt	4.809	11.669	2,4	100	1,0	5.184	1,1	100	1,0	12.686	2,6	100	1,0	2,25	0,92
Phosphocellu- lose-Eluat (Pool II)	45	5.434	120,8	47	50,3	2.784	61,9	54	56,3	6.701	148,9	53	57,3	1,95	0,81
Blue Sepharose CL-6B-Eluat (Pool III)	7,3	2.951	404,2	25	168,4	1.567	214,7	30	195,2	3.734	511,5	29	196,7	1,88	0,79
Hydroxylapatt- Eluat (Pool V)	3,8	2.834	745,8	24	310,8	1.484	390,5	29	355,0	3.317	872,9	26	335,7	1,91	0,85

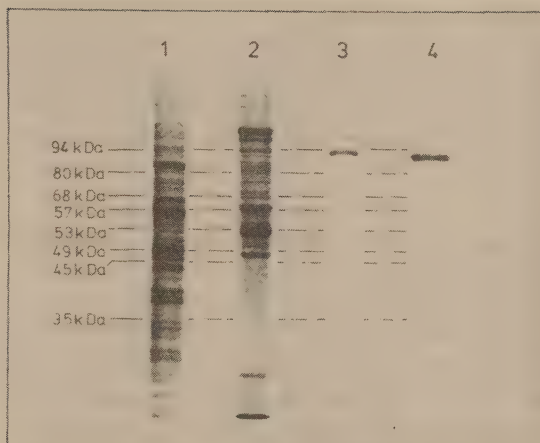


Abb. 4: SDS-PAGE zur Reinigung des Trifunktionellen Enzyms

Die folgenden Proben wurden auf ein 10%iges Polyacrylamidgel (Dicke 2 mm) aufgetragen:

Slot 1: 150 µg Rohextrakt (24 h Acetat/Ölsäure)

Slot 2: 100 µg Phosphocellulose-Eluat (Pool II)

Slot 3: 8 µg Blue Sepharose CL-6B-Eluat (Pool III)

Slot 4: 8 µg Hydroxylapatit-Eluat (Pool V)

Als Markerproteine wurden eingesetzt: Phosphorylase b (94 kDa), Transferrin (80 kDa), BSA (68 kDa), Pyruvatkinase (57 kDa), Glutamatdehydrogenase (53 kDa), Fumarase (49 kDa), Ovalbumin (45 kDa), LDH (35 kDa). Die Anfärbung erfolgte mit Coomassie Blue.

chromatographischen Auftrennung im Phosphatgradienten der Hydroxylapatitsäule war nur noch eine Proteinbande sichtbar. Auch nach Auftrag von größeren Proteinmengen war keine zusätzliche Bande anfärbbar (wird nicht gezeigt). Nach dem Kriterium von SDS-PAGE war das TFE im Pool V des Hydroxylapatit-Eluats zur Homogenität gereinigt.

Im Rohextrakt war die Proteinbande des TFE nur subdominant vertreten. Nimmt man die erwähnten Resultate aus der Reinigung zusammen mit dem Ergebnis aus SDS-PAGE, daß nach dem letzten Reinigungsschritt nur noch eine Proteinbande anfärbbar ist,

so kann dieses als wichtiger Bewertungspunkt für den Nachweis gewertet werden, daß die 2. und 3. Reaktion der β -Oxidation von einem multifunktionellen Protein katalysiert wird, das zusätzlich 3-Hydroxyacyl-CoA Epimerase-Enzymaktivität trägt.

3.2.2.4 Bindung des Trifunktionellen Enzyms an NAD-Agarose

Um den Nachweis der Trifunktionalität des TFE mit zusätzlichen säulenchromatographischen Kriterien zu bereichern, wurde eine Affinitätschromatographie an NAD-Agarose (Type I) durchgeführt. Bei der NAD-Agarose ist NAD an eine Agarose-Hexan-Matrix gekoppelt. Dieses Gelmaterial wurde gewählt, da mit der 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase ein NAD-abhängiges Enzym zur spezifischen Bindung an den Liganden zur Verfügung stand. Als Ausgangsmaterial diente gereinigtes Protein aus dem Hydroxylapatit-Eluat, das zuvor gegen einen 10 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,4 (Puffer B, s. 2.9.4) dialysiert wurde.

Abbildung 5 zeigt das Elutionsprofil von Enoyl-CoA Hydratase, 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase und Epimerase in einem linearen 10-100 mM Tris-HCl-Gradienten bei pH 7,4. Auch hier erfolgte eine Coelution aller drei Enzymaktivitäten mit identischem Elutionsprofil bei einer Leitfähigkeit von 2,4 mS, das entspricht einer Konzentration von 41 mM Tris. Das Verhältnis der Aktivitäten zueinander im Auftrag und im Gradienten war identisch.

Auch auf der NAD-Agarose gelang eine biospezifische Elution des TFE mit NAD nicht (vgl. "dye-ligand" Chromatographie an Blue Sepharose CL-6B, 3.2.2.1), aber durch Erhöhung der Ionenstärke konnten die Aktivitäten des TFE eluiert werden.

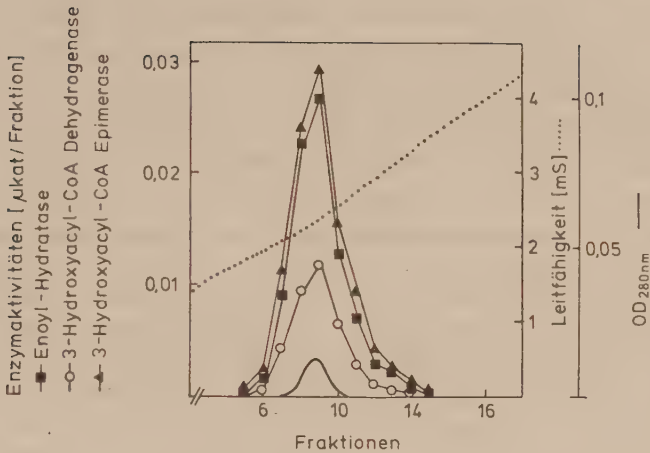


Abb. 5: Affinitätschromatographie an NAD-Agarose

Als Auftrag wurde 120 μ g zur Homogenität gereinigtes TFE benutzt. Die Elution erfolgte durch einen 10-100 mM Tris-HCl-Gradienten, pH 7,4.

3.2.3 Partielle Reinigung der 3-cis,2-trans-Enoyl-CoA Isomerase

Wie bereits beschrieben wurde, konnte die Isomerase an Phosphocellulose P-11 (3.2.1) sowie an Blue Sepharose CL-6B (3.2.2.1) gebunden werden. Bei der letzteren "dye-ligand"-Chromatographie gelang die Abtrennung der Isomerase von den Aktivitäten des Trifunktionellen Enzyms im KCl-Gradienten. Zur weiteren Reinigung wurde mit Pool IV des Blue Sepharose-Eluates weitergearbeitet.

3.2.3.1 Bindung der Isomerase an Hydroxylapatit

Pool IV des Eluates aus dem Gradienten der Blue Sepharose CL-6B (3.2.2.1) wurde auf eine Hydroxylapatitsäule (Ultragel, LKB) gegeben, die zuvor in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4

(Puffer D, s. 2.9.5), äquilibriert wurde.

Die Elution gebundenen Proteins erfolgte durch Anlegen eines linearen Gradienten von 50-100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, wie in Abbildung 6 gezeigt wird.

Die Isomeraseaktivität wurde bei einer Konzentration von durchschnittlich 100 mM Kaliumphosphat von der Gelmatrix abgelöst.

Lediglich 43% der aufgetragenen Isomeraseaktivität konnte in den Fraktionen der Hydroxylapatitsäule wiedergefunden werden. Als Erklärungsmöglichkeit für den relativ hohen Aktivitätsverlust könnte die Eigenschaft des im Hydroxylapatit gebundenen Calciums als Aktivator für metallionenabhängige Proteasen, die sich eventuell als Verunreinigungen noch mit im Eluat der Blue Sepharose befanden, dienen.

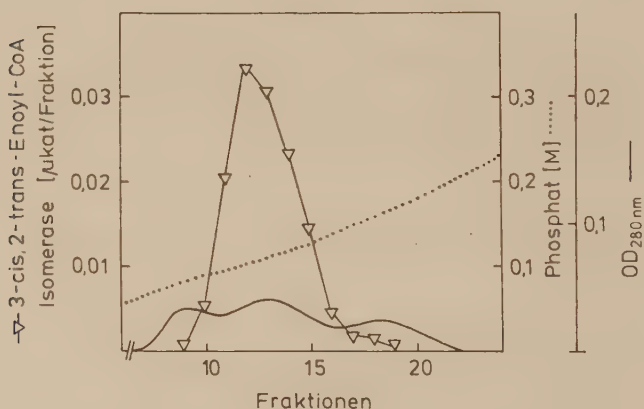


Abb. 6: Elutionsprofil der 3-cis,2-trans-Enoyl-CoA Isomerase an Hydroxylapatit

Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 50-1000 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4. Pool IV aus der Blue Sepharose CL-6B diente als Auftrag.

3.2.3.2 Zusammenfassung der Schritte zur partiellen Reinigung der 3-cis,2-trans-Enoyl-CoA Isomerase

Unter Zuhilfenahme von drei säulenchromatographischen Reinigungsschritten konnte die 3-cis,2-trans-Enoyl-CoA-Isomerase angereichert werden. Diese Schritte umfaßten die Kationenaustauschchromatographie an P-11 (s. 3.2.1), die "dye-ligand"-Chromatographie an Blue Sepharose CL-6B (s. 3.2.2.1) sowie die Adsorptionschromatographie an Hydroxylapatit (s. 3.2.3.1).

Mit der Anreicherung der Isomerase wurde eine deutliche Abtrennung von den Aktivitäten des Trifunktionellen Enzyms gezeigt. Die partielle Reinigung der Isomerase war deswegen von Interesse, weil ein Vergleich des TFE mit der großen Untereinheit des multifunktionellen β -Oxidationskomplexes aus E.coli (32,33), der die Aktivitäten Enoyl-CoA Hydratase, 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase und Epimerase zusammen mit der Isomeraseaktivität umfaßt, nahelag. Die Reinigung wurde in dem Moment notwendig, als sich zeigte, daß die Isomeraseaktivität in der Kationenaustauschchromatographie an P-11 das gleiche Bindungsverhalten zeigte wie das TFE.

Tabelle 3 faßt die Reinigungsschritte in einer Übersicht zusammen. Die Isomerase konnte, bezogen auf die Fraktion 12 des Aktivitätspeaks aus dem Hydroxylapatitgradienten (Abb. 6), 155-fach angereichert werden. Auffällig ist die schlechte Ausbeute im ersten Schritt der Reinigung, der Kationenaustauschchromatographie (vgl. hierzu 3.2.1).

Die Analyse der einzelnen Reinigungsschritte durch SDS-PAGE wird in Abbildung 7 gezeigt. Die Slots 4-8 zeigen die Gelelektrophorese der Fraktionen 10-14 aus dem Hydroxylapatitgradienten (vgl. Abb. 6). Hier wurde der Auftrag gleicher Volumina aus den jeweiligen Gradientenfraktionen gewählt, um den genauen Verlauf des sich ändernden Proteinmusters im Vergleich zu den Messungen der Isomeraseaktivität zu erhalten. Von den dominanten, anfärbbaren Proteinbanden scheinen die bei 30 kDa bzw. 50 kDa liegenden am ehesten dem Aktivitätsverlauf zu entsprechen. Eine genaue Zuordnung konnte jedoch nicht erfolgen.

Tabelle 3: Übersicht über die partielle Reinigung der
3-cis,2-trans-Enoyl-CoA Isomerase aus Neurospora
crassa

70 g Myzel, gewachsen auf 40 mM Natriumacetat und
1 mM Ölsäure als Kohlenstoffquellen, diente als
Ausgangsmaterial.

Fraktion	Gesamt- protein	3-cis,2-trans-Enoyl-CoA Isomerase			
		Aktivität		Ausbeute	Anreicherung
		Gesamt- spez.			
		mg	nkat	$\frac{\text{nkat}}{\text{mg}}$	%
Rohextrakt	4.059	8.308	2,0	100	1,0
Phosphocellulose- Eluat (Pool II)	42,70	517	12,1	6,2	6,1
Blue Sepharose CL-6B-Eluat (Pool IV)	3,80	348	91,6	4,2	45,8
Hydroxylapatit- Eluat (Fr. 12)	0,11	34	309,1	0,4	154,6

Die Isomerase wurde demnach nur partiell gereinigt. Interessanterweise konnte bei 93 kDa noch die dem Trifunktionellen Enzym entsprechende Bande lokalisiert werden. Das TFE, das in geringen Mengen durch Randfraktionen des Isomerasepeaks als Verunreinigung mitgepoolt wurde, wurde im Hydroxylapatitgradienten bei einer anderen, höheren Phosphatkonzentration eluiert, was das unterschiedliche Bindungsverhalten auch an Hydroxylapatit verdeutlicht.

Trotzdem bleibt festzustellen, daß sich das Trifunktionelle Enzym und die Isomerase in Bezug auf ihr Bindungsverhalten an die benutzten Gelmaterialien sehr ähneln, die Abtrennung der Isomerase somit eine wesentliche Voraussetzung war, die Trifunktionalität des zur Homogenität gereinigten TFE zu beurteilen.

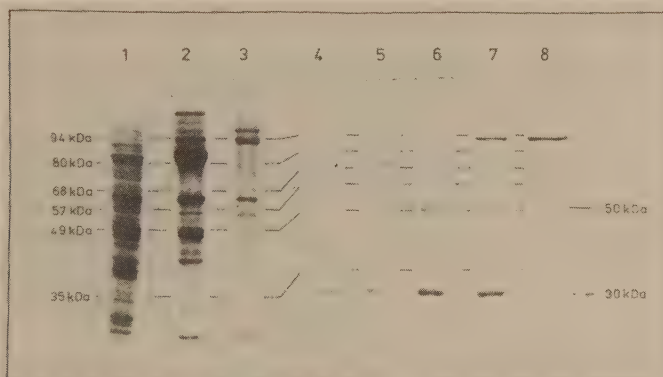


Abb. 7: SDS-PAGE (10%, 2 mm) zur Reinigung der Isomerase

Slot 1: 150 µg Rohextrakt (24 h Acetat/Ülsäure)
Slot 2: 150 µg Phosphocelluloseeluat (Pool II)
Slot 3: 30 µg Blue Sepharose CL-6B-Eluat (Pool IV)
Slot 4-8 zeigt die Fraktionen 10-14 des Eluates der Hydroxylapatitsäule (vgl. Abb. 6) in der Reihenfolge zunehmender Phosphatkonzentration des Gradienten. Hierzu wurde jeweils das gleiche Fraktionsvolumen zur SDS-PAGE aufgearbeitet. Slot 6 enthält 7 µg Protein und 2,2 nkat Isomeraseaktivität.

Die Anfärbung erfolgte durch Coomassie Blue. Als Markerproteine dienten Phosphorylase b (94 kDa), Transferrin (80 kDa), BSA (68 kDa), Pyruvatkinase (57 kDa), Fumarase (49 kDa), LDH (35 kDa).

3.2.4 Reinigung der mitochondrialen Enoyl-CoA Hydratase

Wie aus der Auftrennung eines Rohextraktes bei der Kationenaustauschchromatographie an Phosphocellulose hervorging, verteilte sich die Enoyl-CoA Hydrataseaktivität auf zwei Elutionspeaks. Die erste Hydrataseaktivität konnte als Bestandteil des Trifunktionellen Enzyms identifiziert werden (3.2.2), während die zweite Hydrataseaktivität, wie nachfolgend (3.5) beschrieben wird, einem mitochondrialen Enzym zuzuordnen ist. Zur Unterscheidung der Aktivitäten wird also im Folgenden von der mitochondrialen Enoyl-CoA Hydratase gesprochen.

Die mitochondriale Hydratase konnte im Gradienten der Phosphocellulosesäule von den TFE-Aktivitäten abgetrennt werden (3.2.1). Pool I dieses Eluates diente als Ausgangsmaterial für weitere Reinigungsschritte.

3.2.4.1 Adsorptionschromatographie an Hydroxylapatit

Pool I aus dem Eluat des Gradienten der P-11 (3.2.1) wurde auf die zuvor in einem 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, (Puffer D, 2.9.5) äquilibrierte Hydroxylapatitsäule gegeben. Anschließend wurde ein linearer Gradient von 50-1000 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, angelegt. Die Ablösung der gebundenen Enoyl-CoA Hydratase erfolgte bei einer Konzentration von 260 mM Phosphat, bezogen auf das Aktivitätsmaximum.

Ca. 90% der aufgetragenen Aktivität konnten im Eluat der Säule wiedergefunden werden.

Das Elutionsprofil der Hydratase wird in Abbildung 8 gezeigt. Zur weiteren Reinigung wurden die Fraktionen auf der höchsten Aktivität wie eingezeichnet vereinigt (Pool VI).

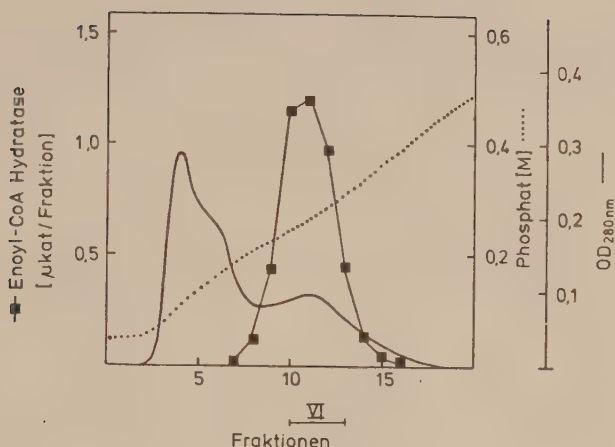


Abb. 8: Adsorptionschromatographie der mitochondrialen Enoyl-CoA Hydratase an Hydroxylapatit
 Als Auftrag diente Pool I des Phosphocellulose-Eluates. Die Elution erfolgte mit einem linearen 50-1000 mM Kaliumphosphatpuffer-Gradienten bei pH 7,4. Die zu einem Pool vereinigten Fraktionen wurden mit VI gekennzeichnet.

3.2.4.2 Bindung an Blue Sepharose CL-6B

Um eine Bindung der mitochondrialen Hydratase-Aktivität an das Farbstoffgel zu ermöglichen, wurde Pool VI aus dem vorhergehenden Reinigungsschritt, dem Hydroxylapatiteluat, zur Herabsetzung der Ionenstärke gegen Puffer A (2.6.1) dialysiert, bis eine Leitfähigkeit von 5 mS erreicht wurde. Nach dem anschließenden Auftrag der Probe und Spülen des Säulenmaterials wurde ein linearer 0-1 M KCl-Gradient (in Puffer A) angelegt, wie unter 2.9.2, Methode B, beschrieben wurde.

Abbildung 9 zeigt das Profil der Enoyl-CoA Hydratase-Messungen im Verlauf des Gradienten. Das Aktivitätsmaximum wurde bei einer Leitfähigkeit von 23 mS gemessen, was einer 0,25 M KCl-Konzentration entspricht.

Nahezu 100% der aufgetragenen Aktivität wurde im Eluat der Blue Sepharose wiedergefunden.
Für den nachfolgenden Reinigungsschritt wurden Fraktionen zu Pool VII vereinigt, wie es in Abbildung 9 gekennzeichnet ist.

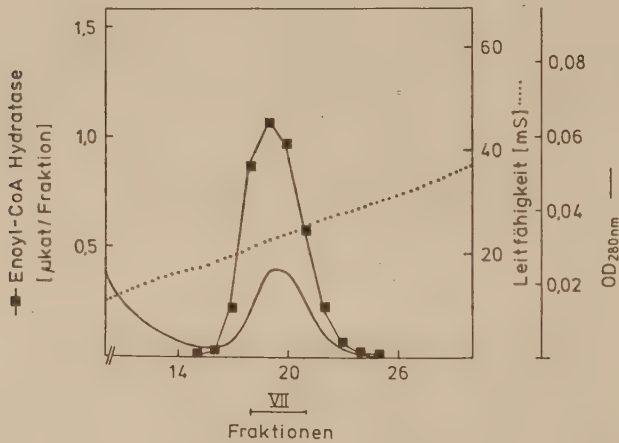


Abb. 9: "Dye-ligand"-Chromatographie der mitochondrialen Enoyl-CoA Hydratase an Blue Sepharose CL-6B

Pool VI aus dem Hydroxylapatit-Eluat wurde aufgetragen, dann ein 0-1 M KCl-Gradient angelegt.

VII kennzeichnet die zur weiteren Reinigung vereinigten Fraktionen.

3.2.4.3 Bindung an Matrex Gel Red A

Matrex Gel Red A ist ein Farbstoffgel, an dessen Matrix der Farbstoff Procion red HE 3B gebunden ist. Diese "dye-ligand"-Chromatographie stellte den letzten Reinigungsschritt für die mitochondriale Enoyl-CoA Hydratase dar.

Hierzu wurde Pool VII aus dem Blue Sepharose-Gradienten (3.2.4.2) zur Herabsetzung der Ionenstärke gegen Puffer A (2.6.1) dialysiert und anschließend aufgetragen. Die an das Gel gebundene Hydratase wurde mit einem linearen 0-1 M KCl-Gradienten eluiert.

Abbildung 10 zeigt die Verteilung der Enoyl-CoA Hydratase-Aktivität im Gradienten. Das Aktivitätsmaximum besaß eine Leitfähigkeit von 22 mS (0,24 M KCl). Die Hydratase-Aktivität konnte vollständig im Eluat ohne meßbaren Aktivitätsverlust in Bezug auf den Auftrag wiedergefunden werden.

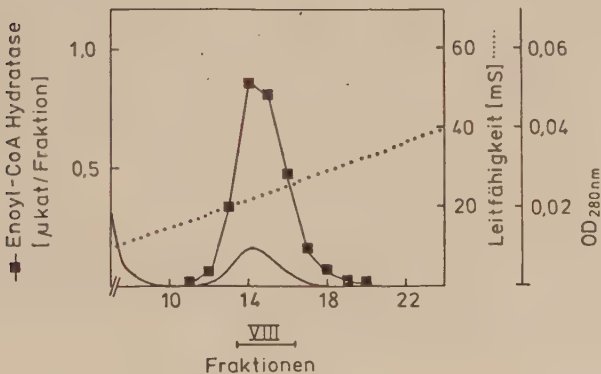


Abb. 10: "Dye-ligand"-Chromatographie an Matrex Gel Red A

Messung der mitochondrialen Enoyl-CoA Hydratase in einem 0-1 M KCl-Gradienten.

VIII umfaßt die zu einem Pool vereinigten Fraktionen. Als Auftrag wurde Pool VII der Blue Sepharose CL-6B verwendet.

3.2.4.4 Zusammenfassung der Reinigung der mitochondrialen Enoyl-CoA Hydratase

Die Reinigung der mitochondrialen Enoyl-CoA Hydratase umfaßte vier Reinigungsschritte:

1. Abtrennung von der Hydrataseaktivität des Trifunktionellen Enzyms aus dem Rohextrakt durch Kationenaustauschchromatographie an Phosphocellulose P-11 (3.2.1)
2. Adsorption an Hydroxylapatit (3.2.4.1)
3. "Dye-ligand"-Chromatographie an Blue Sepharose CL-6B (3.2.4.2)
und
4. "Dye-ligand"-Chromatographie an Matrex Gel Red A (3.2.4.3)

Eine Übersicht über die Effektivität der einzelnen Reinigungsschritte wird in der Reinigungstabelle einer typischen Aufarbeitung in Tabelle 4 gegeben.

Die relativ schlechte Ausbeute aus dem Eluat der Phosphocellulosesäule läßt sich aus der Verteilung der Aktivitäten über zwei Peaks ableiten, deren zweiter Peak der Hydrataseaktivität des TFE zuzuordnen war. Die Kationenaustauschchromatographie an P-11 (21-fache Anreicherung) stellte zusammen mit der nachfolgenden Adsorption an Hydroxylapatit (16-fache Anreicherung bezogen auf den vorangegangenen Reinigungsschritt) den quantitativ bedeutendsten Reinigungsschritt dar.

Nach der "dye-ligand"-Chromatographie an Matrex Gel Red A wurde eine 917-fache Anreicherung der Hydratase bei einer spezifischen Enzymaktivität von 3945 nkat/mg (gemessen mit 2-trans-Decenoyl-CoA) erreicht.

Tabelle 4: Reinigungstabelle der mitochondrialen Enoyl-CoA Hydratase aus Neurospora crassa

65 g Myzel, auf 40 mM Natriumacetat und 1 mM Ölsäure als Kohlenstoffquellen gewachsen, diente als Ausgangsmaterial für einen typischen Reinigungsgang.

Fraktion	Gesamt-protein	Enoyl-CoA Hydratase			
		Aktivität		Ausbeute	Anreicherung
		Gesamt-	spez.		
	mg	nkat	$\frac{\text{nkat}}{\text{mg}}$	%	-fach
Rohextrakt	3.911	16.817	4,3	100	1,0
Phosphocellulose-Eluat (Pool I)	61	5.601	91,8	33	21,3
Hydroxylapatit-Eluat (Pool VI)	3,1	4.418	1.425,2	26	331,4
Blue Sepharose CL-6B-Eluat (Pool VII)	0,9	2.851	3.167,8	17	736,7
Matrex Gel Red A-Eluat (Pool VIII)	0,6	2.367	3.945,0	14	917,4

Abbildung 11 zeigt die Analyse der einzelnen Reinigungsschritte durch SDS-PAGE. Pool VIII des Eluates aus dem KCl-Gradienten von Matrex Gel Red A weist nur noch eine Proteinbande auf. Das Enzym besitzt demnach Untereinheiten identischen Molekulargewichtes (vgl. 3.3.2).

Unter Zugrundelegen des Kriteriums der Polyacrylamidgelelektrophorese konnte die mitochondriale Enoyl-CoA Hydratase zur Homogenität gereinigt werden.

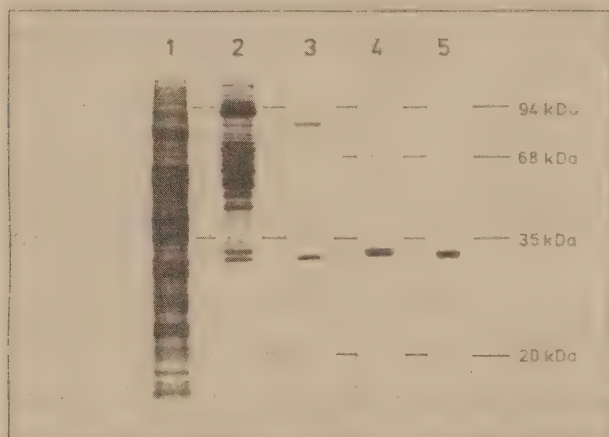


Abb. 11: 12% SDS-PAGE (2 mm) zur Reinigung der mitochondrialen Enoyl-CoA Hydratase

Slot 1: 150 µg Rohextrakt (24 h Ölsäure/Acetat)
Slot 2: 85 µg Phosphocellulose-Eluat (Pool I)
Slot 3: 15 µg Hydroxylapatit-Eluat (Pool VI)
Slot 4: 15 µg Blue Sepharose CL-6B-Eluat (Pool VII)
Slot 5: 10 µg Matrex Gel Red A-Eluat (Pool VIII)

Die Färbung der Proteinbanden erfolgte durch Coomassie Blue. Als Markerproteine dienten Phosphorylase b (94 kDa), BSA (68 kDa), LDH (35 kDa), Trypsininhibitor (20 kDa).

3.3 Molekulare Charakterisierung der mitochondrialen Enoyl-CoA Hydratase und des Trifunktionellen Enzyms

3.3.1 Bestimmung der Molekulargewichte der Untereinheiten

Die Molekulargewichte der Untereinheiten der mitochondrialen Enoyl-CoA Hydratase und des Trifunktionellen Enzyms wurden nach elektrophoretischer Auftrennung durch SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen nach Lämmli (108) bestimmt.

Hierzu wurde die Beziehung des dekadischen Logarithmus des Molekulargewichtes zum R_F -Wert der betreffenden Proteine nach Shapiro et al. (137) berechnet. Als Eichproteine wurden Phosphorylase b (94 000), Transferrin (80 000), BSA (68 000), Pyruvatkinase (57 000), Glutamatdehydrogenase (53 000), LDH (35 000), Trypsininhibitor (20 100) und Myoglobin (17 800) verwendet. Die Erstellung der in Abbildung 12 A und B gezeigten Eichgeraden erfolgte durch lineare Regression und gibt Mittelwerte von mehr als 20 Eichgelen wieder.

Abbildung 12 A zeigt die Eichgerade für das Trifunktionelle Enzym, die in 10%igen Polyacrylamidgelen ermittelt wurde. Das Molekulargewicht der Untereinheit des Trifunktionellen Enzyms beträgt demnach 92 800 mit einer Standardabweichung von 1 200 bezogen auf den Mittelwert.

Für die Erstellung von Eichgeraden zur mitochondrialen Enoyl-CoA Hydratase wurde SDS-PAGE in 12%igen Gelen durchgeführt. Für die Hydrataseuntereinheiten wurde ein Molekulargewicht von 30 900 mit einer Standardabweichung von 1 100 ermittelt.

Abbildung 13 A zeigt das Elutionsprofil der zur Homogenität gereinigten mitochondrialen Enoyl-CoA Hydratase. Die Elution erfolgte zwischen den Peaks der Markerproteine Katalase und Lactatdehydrogenase. Das Molekulargewicht berechnet sich auf 182 000 mit einer Standardabweichung von 5000 bezogen auf mehrere durchgeführte Versuche (Abbildung 13 C). Das native Enzym verhält sich demnach, in Bezug auf die Analyse der Untereinheiten aus SDS-PAGE, unter den Bedingungen der Gelchromatographie wie ein hexameres Protein, bestehend aus sechs Untereinheiten identischen Molekulargewichtes ($6 \times 31\ 000$).

Das Verhalten des Trifunktionellen Enzyms bei der Gelchromatographie wird in Abbildung 13 B gezeigt. Auch hier, im Vergleich zu anderen säulenchromatographischen Auftrennungen, erfolgte die Elution aller drei Enzymaktivitäten mit dem gleichen Elutionsprofil, was einen zusätzlichen Bewertungspunkt zur Frage der Multifunktionalität des Proteins ergab. Abbildung 13 C gibt Auskunft über das berechnete Molekulargewicht. Es lag unter den gewählten Bedingungen bei 365 000 mit einer Standardabweichung von 13 000 um den Mittelwert aus mehreren Versuchen. Das TFE besteht demzufolge offensichtlich aus vier Untereinheiten identischen Molekulargewichts ($4 \times 93\ 000$).

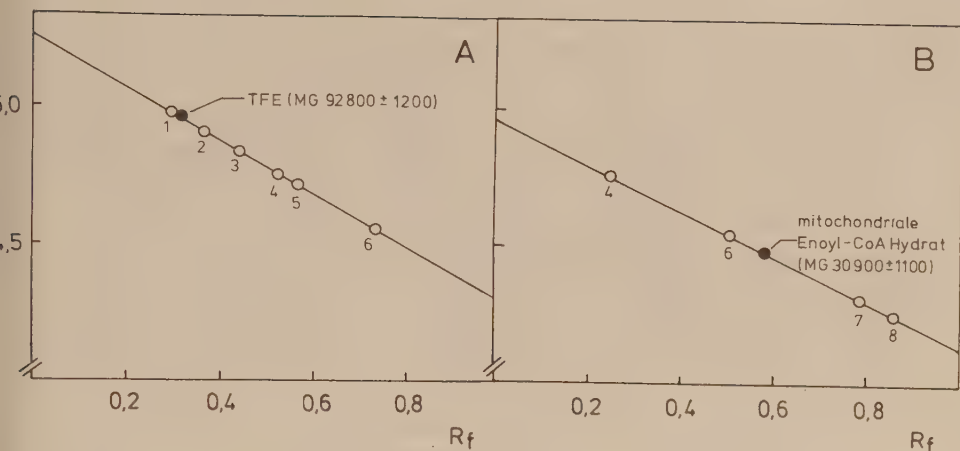


Abb. 12: Molekulargewichtsbestimmung der Untereinheiten in SDS-PAGE

Als Eichproteine (o) wurden verwendet:

1: Phosphorylase b (94 000), 2: Transferrin (80 000), 3: BSA (68 000), 4: Pyruvatkinase (57 000), 5: Glutamatdehydrogenase (53 000), 6: LDH (35 000), 7: Trypsininhibitor (20 100), 8: Myoglobin (17 800).

A zeigt die Eichgerade für das Trifunktionelle Enzym, B die Eichgerade für die mitochondriale Enoyl-CoA Hydratase.

3.3.2 Bestimmung der Molekulargewichte der nativen Enzyme

Die Bestimmung der Molekulargewichte der nativen Proteine wurde durch Gelfiltration an Sephacryl S-300 durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde eine entsprechende Säule mit Standardproteinen (Ferritin: 880 000 bzw. 440 000, Katalase: 235 000, LDH: 140 000 und Alkohol-Dehydrogenase: 80 000) geeicht. Das Ausschlussvolumen der Säule wurde mit Blue Dextran 2000 bestimmt. Die Molekulargewichte der Enoyl-CoA Hydratase und des Trifunktionellen Proteins wurden durch Anlegen einer Eichgeraden ermittelt, die nach Andrews (138) aus dem dekadischen Logarithmus der Molekulargewichte der Eichproteine und dem K_{av} -Wert durch lineare Regression berechnet wurden (Abbildung 13 C).

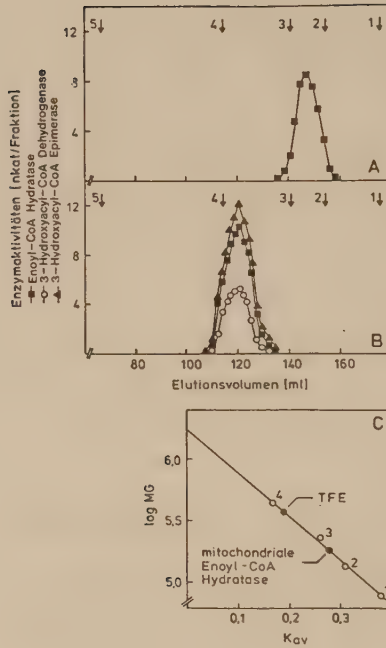


Abb. 13: Gelfiltration an Sephacryl S-300 zur Bestimmung des Molekulargewichtes der nativen Enzyme

A: Elutionsprofil der mitochondrialen Enoyl-CoA Hydratase

B: Elutionsprofil des Trifunktionellen Enzyms

Die Elution der Eichproteine wird in A und B durch nummerierte Pfeile angezeigt.

C: Eichgerade zur Bestimmung der Molekulargewichte nach Andrews (138)

Als Eichproteine wurden verwendet:

1: Alkoholdehydrogenase (80 000), 2: LDH (140 000), 3: Katalase (235 000), 4: Ferritin-Monomer (440 000).

Das Ausschlußvolumen wurde durch 5 (Blue Dextran 2000) angezeigt. Ferritin-Dimer (880 000) wurde auf der Säule nicht retardiert, befand sich im Ausschlußvolumen der Säule und konnte sonst nicht zur Erstellung der Eichgeraden herangezogen werden.

3.3.3 Vergleich der Hitzestabilität

Mitochondriale Enoyl-CoA Hydratase und die Hydrataseaktivität des Trifunktionellen Enzyms wurden auf ihre Hitzestabilität untersucht. Hierzu wurden gereinigte Proteinlösungen im Wasserbad bei 57°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten (Abb. 14) wurde jeweils ein Aliquot zur Enzymbestimmung entnommen. Während auch nach 25 min Hitzebehandlung kein meßbarer Aktivitätsverlust bei der mitochondrialen Hydratase vorlag, ging die Hydrataseaktivität des TFE schon nach 2 min vollständig verloren.

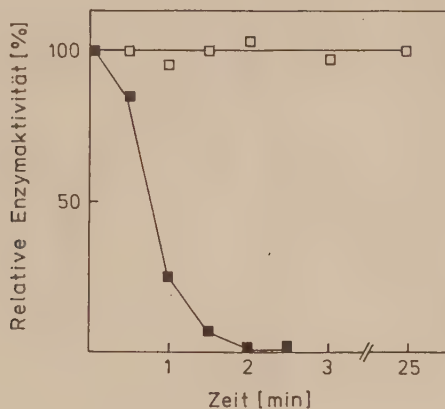


Abb. 14: Vergleich der Hitzestabilität von mitochondrialer Enoyl-CoA Hydratase (—□—) mit der Hydrataseaktivität des Trifunktionellen Enzyms (—■—) bei 57°C

3.3.4 Vergleich der pH-Optima der Enoyl-CoA Hydrataseaktivitäten

Ein Vergleich der pH-abhängigen Reaktionen der mitochondrialen Enoyl-CoA Hydratase und der Hydrataseaktivität des Tri-funktionellen Enzyms zeigt nur geringfügige Unterschiede bezüglich jeweiligen pH-Optimums, das für das mitochondriale Protein bei pH 9,7, für das TFE bei pH 9,2 liegt (Abbildung 15).

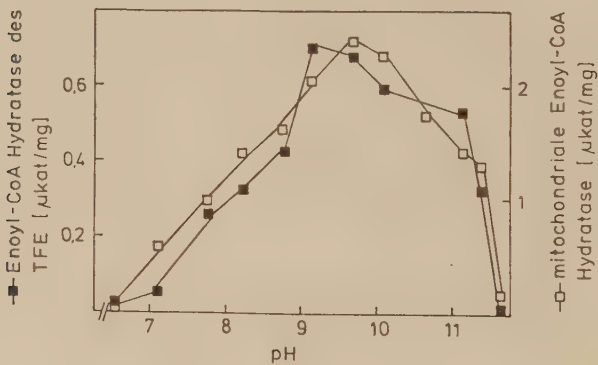


Abb. 15: pH-Optimum der Enoyl-CoA Hydrataseaktivitäten

3.3.5 Ermittlung der Michaelis-Konstanten

Die Michaelis-Konstanten (K_m) und V_{max} -Werte für die Hydrataseaktivität von mitochondrialer Enoyl-CoA Hydratase und TFE wurden mit 2-trans-Decenoyl-CoA als Substrat ermittelt.

Die Meßwerte sind in den Diagrammen nach Michaelis-Menten und in reziproker Form nach Lineweaver-Burk in Abbildung 16 dargestellt.

Die mitochondriale Hydratase hat einen K_m -Wert von $8,33 \times 10^{-5}$ mol/l, V_{max} liegt bei 3357 nkat/mg. Das Trifunktionelle Enzym dagegen weist einen K_m -Wert von $2,30 \times 10^{-5}$ mol/l auf.

V_{max} des TFE liegt bei 1426 nkat/mg.

Alle Messungen wurden jeweils mit dem gereinigten Enzym durchgeführt.

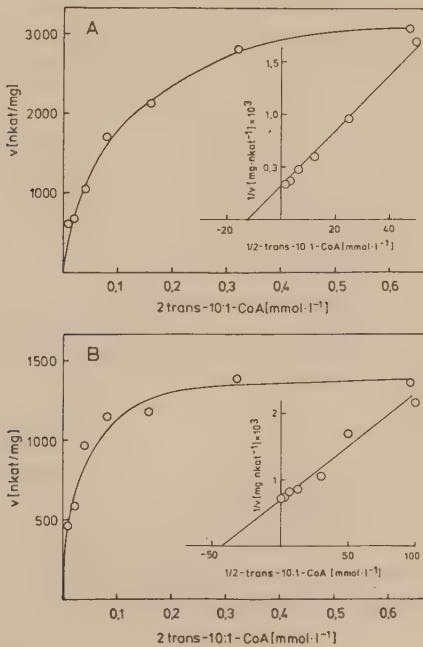


Abb. 16: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration (2-trans-Decenoyl-CoA) nach Michaelis-Menten und Lineweaver-Burk.
Diagramm A: mitochondriale Enoyl-CoA Hydratase
Diagramm B: TFE

3.3.6 Substratspezifität der Enoyl-CoA Hydrataseaktivitäten

Zum Vergleich der Substratspezifität der Enoyl-CoA Hydrataseaktivitäten des TFE und der mitochondrialen Hydratase wurden jeweils konstante Mengen der gereinigten Enzyme mit konstanten Konzentrationen (0,1 mM) 2-trans-ungesättigter Fettsäure-CoA-Ester mit unterschiedlichen Kettenlängen in den Enzymtest eingesetzt. Eine Überprüfung, welchem Sättigungsgrad die eingesetzte Substratkonzentration der unterschiedlichen Fettsäuren im Enzymtest jeweils entspricht, wurde nicht durchgeführt.

Wie aus Abbildung 17 ersichtlich ist, setzen beide Enzyme bevorzugt mittelkettige Fettsäure-CoA-Ester um. Maximale Umsetzung erfolgte bei der mitochondrialen Enoyl-CoA Hydratase bei der ungesättigten Verbindung mit 12 Kohlenstoffatomen, beim TFE bei solchen mit 8 C-Atomen.

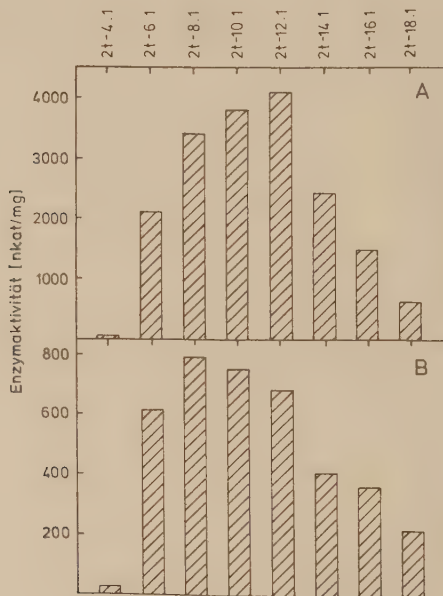


Abb. 17: Kettenlängenspezifität der mitochondrialen Enoyl-CoA Hydratase (A) und des TFE (B).
Es wurden konstante Mengen gereinigter Enzymfraktionen und je 0,1 mM Enoyl-CoA-Ester eingesetzt.

3.3.7 Zweidimensionale Gelelektrophoresen des Trifunktionellen Enzyms

Die zweidimensionalen Gelelektrophoresen, die eine hochauflösende Auftrennung von denaturierten Proteinproben nach ihrer Ladung und Molekülgröße erreichen, wurden unter zwei Gesichtspunkten durchgeführt: Es sollte der ungefähre isoelektrische Punkt der Untereinheiten des Trifunktionellen Enzyms bestimmt werden bei gleichzeitiger Untersuchung zur Identität der Untereinheiten, die in SDS-PAGE die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit bei 93 kDa aufweisen, um außerdem ein zusätzliches Kriterium zur Homogenität der gereinigten Enzymproben zu erhalten.

Daher wurde für die jeweilig durchgeführte erste Dimension (Auftrennung nach Ladung) ein breiter pH-Bereich gewählt. Abbildung 18 zeigt die Auftrennung einer gereinigten Probe des TFE im IEF/SDS-PAGE-System nach O'Farrell (110) über einen pH-Bereich von 3-10 mit gleichzeitig aufgetragenen Standardproteinen mit bekannten isoelektrischen Punkten (pI). Es ist deutlich zu erkennen, daß die 93 kDa-Bande kaum in das Isoklassifizierungsgel wanderte, somit ein stark basisches Polypeptid darstellt. Der pI der 93 kDa-Untereinheit des TFE ist nach Berechnung einer Eichgeraden aus der Wanderungsstrecke der Standardproteine (wird nicht gezeigt) $\geq$ pH 9. Eine genaue Bestimmung konnte in diesem System bei sehr basischen Proteinen nicht durchgeführt werden, weil sich der Proteinspot des TFE gerade an der Grenze des Auflösungsvermögens dieses Systems bewegte. Dieser Umstand ist aller Wahrscheinlichkeit nach auch die Hauptursache für das "streaking", der Streifenbildung des Spots. Auch ein multifaktorieller Prozeß ist für das "streaking" denkbar: zur Basizität eventuell zusätzlich eine schlechte Löslichkeit des Proteins im IEF-Gel mit möglicher Aggregatbildung (110), Ladungsheterogenität aufgrund artifizieller Modifikationen einzelner Aminosäuren bei der Aufarbeitung (139), oder eine Carboxylierung des Proteins in Anwesenheit von Isocyanat durch Abbau des Harnstoffs im Gel.

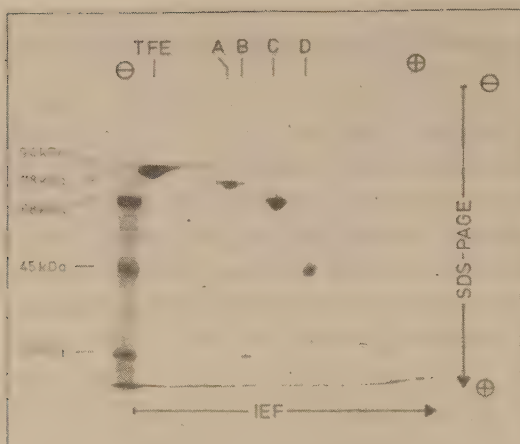


Abb. 18: Zweidimensionale Gelelektrophorese im IEF/SDS-PAGE-System nach O'Farrell (110).

30 µg gereinigtes Trifunktionelles Enzym wurde zusammen mit einer Mischung aus Standardproteinen wie im Material- und Methodenteil unter 2.14.1 beschrieben behandelt und den Elektrophoresen unterworfen (IEF: pH 3-10; 10% SDS-PAGE).

Als Standardproteine wurden verwendet:

A: Conalbumin (pI 7,1/78 kDa), B: Carboanhydrase (pI 6,8/29 kDa), C: BSA (pI 6,3/68 kDa), D: Ovalbumin (pI 5,6/45 kDa).

Als Molekulargewichtsmarker wurde zusätzlich Phosphorylase b (94 kDa) eingesetzt.

Anode (⊕) und Kathode (⊖) sowie die Ausrichtung der jeweiligen Elektrophorese sind eingezeichnet.

Die Anfärbung erfolgte mit Coomassie Blue.

Eine bessere Auflösung des basischen Bereiches wurde durch die Nonequilibrium-pH-Gradientenelektrophorese (NEPHGE) nach O'Farrell et al. (112) erzielt. Abbildung 19 zeigt, daß sich nach dieser Methode die Untereinheiten des TFE weder in ihrer Ladung noch in ihrem Molekulargewicht unterscheiden. Eine Bestimmung des absoluten isoelektrischen Punktes ist in NEPHGE-Gelen nicht möglich, weil der pH-Gradient sich erst gleichzei-

tig mit der Wanderung der Proteine ausgebildet. Außerdem könnte unter diesen gegenüber einfacher SDS-PAGE noch sensitiveren analytischen Bedingungen die Homogenität der aufgetragenen Proteinprobe unterstrichen werden. Die Nachweisgrenze liegt hier bei Coomassie-Anfärbung bei ca. 0,01 µg Protein (110).



Abb. 19: Zweidimensionale Gelelektrophorese im NEPHGE/SDS-PAGE-System nach O'Farrell et al. (112)

3 µg gereinigtes Trifunktionelles Protein wurde wie unter 2.14.2 beschrieben behandelt und den zwei Elektrophoresen unterworfen (NEPHGE: pH 3-9, 1600 Vh/ 10% SDS-PAGE).

Anode (⊕) und Kathode (⊖) sowie die Ausrichtung der Elektrophoresen werden angezeigt.

Die Anfärbung erfolgte mit Coomassie Blue.

3.4 Immunologische Charakterisierungen

3.4.1 Immunologische Charakterisierung der mitochondrialen Enoyl-CoA Hydratase

3.4.1.1 Gewinnung von Antiserum

Die Gewinnung eines spezifischen Antiserums gegen mitochondriale Enoyl-CoA Hydratase erfolgte wie in 2.16.1.1 beschrieben mit einer Lösung gereinigten, nativen Proteins. Zur Primärinjektion wurden 280 µg Protein in kompletten Freundschens Adjuvans intramuskulär in die Hinterläufe eines Kaninchens appliziert. Die erste Boosterinjektion erfolgte mit 230 µg gereinigter Enoyl-CoA Hydratase 10 Tage nach der Primärinjektion, die zweite Boosterinjektion nach weiteren 12 Tagen mit der gleichen Menge des Proteins.

Am 27. Tag der Immunisierung wurde das Kaninchen unter Narkose durch Herzpunktion entblutet. Das nach Entfernung zellulärer Bestandteile durch Zentrifugation gewonnene Antiserum wurde bei -20°C gelagert.

3.4.1.2 Überprüfung der Spezifität des Antiserums im Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony

In der Doppeldiffusionsanalyse nach Ouchterlony (114) war nach 48-stündiger Inkubation von Antiserum und Antigen jeweils nur eine Präzipitinbande sichtbar. Als Antigenlösung wurden sowohl gereinigte mitochondriale Enoyl-CoA Hydratase (Abb. 20 A) als auch Rohextrakt aus acetat-/ölsäuregewachsenen N.crassa-Hyphen verwendet (Abb. 20 B).

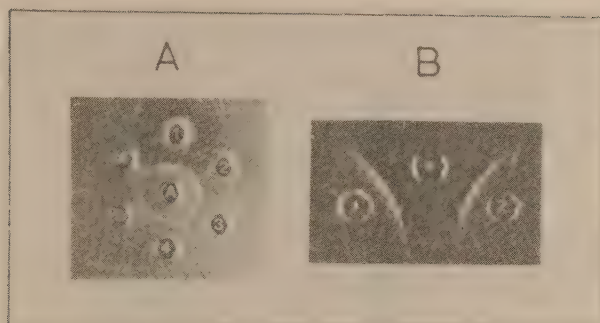


Abb. 20: Doppeldiffusionsanalyse nach Ouchterlony

- A: In das Zentraldepot (A) wurde gereinigte mitochondriale Enoyl-CoA Hydratase (0,8 µg), in die Depots 1-6 das entsprechende Antiserum in den Verdünnungen 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 und 1:32 in TBS pipettiert.
- B: In das Zentraldepot (a) wurde Antiserum gegen mitochondriale Hydratase, in die Depots 1 und 2 je 170 µg Rohextrakt (24 h Acetat/Ölsäure) eingefüllt.

3.4.1.3 Überprüfung der Spezifität des Antiserums durch Immunoblotting

Abbildung 21 zeigt die immunspezifische Anfärbung der mitochondrialen Enoyl-CoA Hydratase nach Western Blotting mit anschließendem ELISA.

Jeweils nur die der Hydratase zuzuordnende Bande (31 kDa) wurde bei einer Antiserumverdünnung von 1:500 sowohl im Rohextrakt als auch bei Auftrag des gereinigten Proteins immunspezifisch angefärbt.

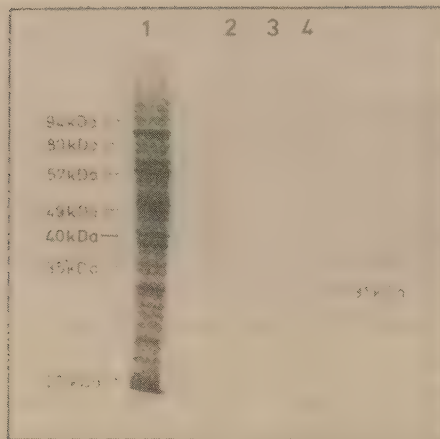


Abb. 21: Immunoblotting der mitochondrialen Enoyl-CoA Hydratase

Spalte 1: 150 µg Rohextrakt aus acetat-/ölsäuregewachsenen Zellen, Coomassie Blue gefärbt

Spalte 2: 50 µg Rohextrakt, immunspezifisch gefärbt

Spalte 3: 100 µg Rohextrakt, immunspezifisch gefärbt

Spalte 4: 0,4 µg gereinigte mitochondriale Enoyl-CoA Hydratase, immunspezifisch gefärbt

Für die immunspezifische Färbung wurde das Antiserum gegen mitochondriale Enoyl-CoA Hydratase 1:500 verdünnt.

Phosphorylase b (94 kDa), Transferrin (80 kDa), Pyruvatkinase (57 kDa), Fumarase (49 kDa), Aldolase (40 kDa), LDH (35 kDa) und Trypsininhibitor (20 kDa) wurden als Molekulargewichtsmarker eingesetzt.

3.4.1.4 Bestimmung des Antiserumtiters durch Sewell-Titration

Die Immuntitration nach Sewell (116) ist eine Methode, die es erlaubt, unter definierten Bedingungen den Serumtiter für ein spezifisches Antigen durch Immunpräzipitation zu ermitteln. Überschüssiges Antiserum bzw. Antigen macht sich hierbei in Deflektionen der Präzipitinbande in der Doppeldiffusionsanalyse bemerkbar. (Zur Durchführung vgl. 2.16.4.2.)

Abbildung 22 zeigt, daß sich der Äquivalenzpunkt zwischen 0,089 μg (Depot 5) und 0,107 μg (Depot 6) eingesetzter mitochondrialer Enoyl-CoA Hydratase bezogen auf 1 μl Antiserum befindet, da sich zwischen diesen Konzentrationen die Ausrichtung der Deflektion der Präzipitinbande ändert.

1 μl spezifisches Antiserum vermag daher unter den gewählten Inkubationsbedingungen (2 h bei Raumtemperatur, 24 h bei 4°C) durchschnittlich 0,098 μg mitochondriale Enoyl-CoA Hydratase zu binden.

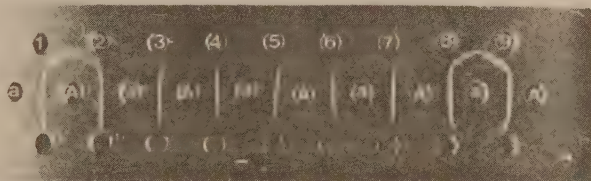


Abb. 22: Immuntitration nach Sewell

Depot A: 1,2 μg mitochondriale Enoyl-CoA Hydratase

Depot a: Antiserum

In die Depots 1-9 wurden die Oberstände nach Abzentrifugieren der Immunpräzipitate von Inkubationsansätzen gefüllt, die unterschiedlichen Mengen gereinigter Enoyl-CoA Hydratase bezogen auf 1 μl Antiserum enthielten:

1: 0,007 μg , 2: 0,018 μg , 3: 0,036 μg , 4: 0,053 μg ,
5: 0,089 μg , 6: 0,107 μg , 7: 0,126 μg , 8: 0,144 μg ,
9: 0,180 μg .

Die Depots der unteren Reihe wurden nicht verwendet.
Zur Durchführung des Tests s. 2.16.4.2.

3.4.1.5 Bestimmung der mitochondrialen Enoyl-CoA Hydrataseaktivität nach Immuntitration

Es wurden Ansätze, die jeweils 0,46 μg gereinigter mitochondrialer Enoyl-CoA Hydratase (1,9 nkat) enthielten, mit unterschiedlichen Mengen Antiserum bzw. Präimmunsrum versetzt und dann 2 h bei Raumtemperatur und 18 h bei 4°C inkubiert (vgl. 2.16.4.1). Nach Abzentrifugieren der Immunpräzipitate wurde jeweils ein Aliquot des Überstandes in den Enzymtest eingesetzt.

Die Abnahme der Hydrataseaktivität bei zunehmender Antiserumkonzentration wird in Abb. 23 gezeigt. 8 μl Antiserum waren ausreichend, um 50% der Aktivität, 40 μl um die gesamte Aktivität von 0,46 μg Enoyl-CoA Hydratase zu hemmen.

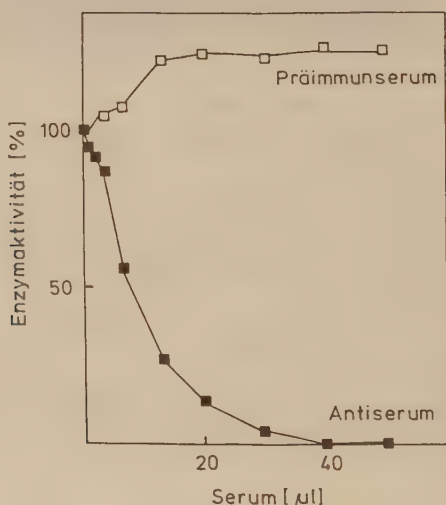


Abb. 23: Immuntitration der mitochondrialen Enoyl-CoA Hydratase durch direkte Immunpräzipitation

Jeweils 0,46 μg gereinigtes Enzym wurde mit unterschiedlichen Mengen Präimmunsrum bzw. Antiserum versetzt und wie in 2.16.4.1 beschrieben inkubiert. Nach Abzentrifugieren der Immunpräzipitate wurde ein Aliquot des Überstandes in den Enzymtest eingesetzt.

3.4.2 Immunologische Charakterisierung des Trifunktionellen Enzyms

3.4.2.1 Gewinnung von Antiserum gegen natives Trifunktionelles Enzym

Antiserum wurde wie in 2.16.1.1 beschrieben durch Immunisierung von Kaninchen mit Proteinlösungen, welche gereinigtes, natives Trifunktionelles Enzym enthielten, gewonnen.

Die Primärinjektion erfolgte mit 350 µg Protein, das zuvor mit CFA zur Erzeugung einer stabilen Emulsion vermischt wurde. Nach 26 Tagen erfolgte die erste Boosterinjektion mit 350 µg TFE, gefolgt von einer zweiten Boosterinjektion nach weiteren 14 Tagen mit 300 µg TFE. 10 Tage nach der letzten Injektion wurde dem Kaninchen unter Narkose 150 µl Blut durch Herzpunktion entnommen. Hieraus wurde 94 ml Antiserum gewonnen, welches bei -20°C aufbewahrt wurde.

3.4.2.2 Überprüfung der Spezifität des Antiserums im Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony

Abbildung 24 zeigt Doppeldiffusionsanalysen nach Ouchterlony (114). Sowohl mit gereinigtem Trifunktionellem Enzym (A, B, D) als auch mit Rohextrakt (D) wurde jeweils nur eine Präzipitinbande mit dem Antiserum erzeugt.

Jedoch ist hierbei anzumerken, daß in einigen Fällen, in denen 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, als Grundpuffer verwendet wurde, die Erzeugung von drei Präzipitationslinien beobachtet werden konnte (Abb. C). Da hierbei Protein verwendet wurde, das nach den in dieser Arbeit dargelegten Analysen als zur Homogenität gereinigtes Trifunktionelles Protein bestimmt wurde, sind unspezifische Präzipitationen ausgeschlossen. Zudem konnte durch vergleichende Analysen, in denen jeweils die gleiche Proteinprobe in unterschiedlichen Puffersystemen der Diffusion ausgesetzt wurde, gezeigt werden, daß sich die Erzeugung

von drei Präzipitinbanden in diesen Untersuchungen auf die Wahl eines 10 mM Kaliumphosphatpuffers beschränkt (Abb. 24 A, B, C). Eine Erklärungsmöglichkeit würde die Aufspaltung des nach der Enzymreinigung als tetrameres Protein vorliegenden TFE in unterschiedliche Oligomerisierungsstufen in Abhängigkeit zum verwendeten Puffersystem bieten. Da jedoch das beschriebene Phänomen sich nicht bei allen durchgeführten Analysen zeigte, erweist sich die Folgerung einer allgemeingültigen Regel hieraus als ungerechtfertigt. Andere analytische Methoden (z.B. Gelfiltration unter Verwendung unterschiedlicher Puffersysteme) konnten keine zusätzliche Information liefern.

Abbildung 24 E zeigt, daß Immunpräzipitationen auch mit denaturierenden Proteinproben, die in Trispuffer mit 0,2% (w/v) SDS gelöst wurden, möglich sind, wobei sich unter den angegebenen Bedingungen nur eine Präzipitinbande zeigte.

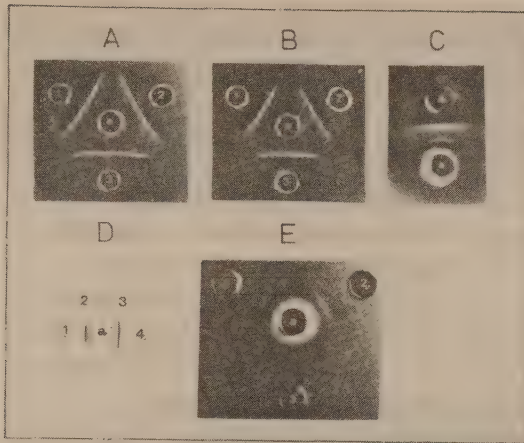


Abb. 24: Doppeldiffusionsanalyse nach Ouchterlony

A: 1% (w/v) Agarose in 50 mM Tris-HCl, pH 7,4,
0,9% (w/v) NaCl
Das Zentraldepot (a) enthält Antiserum gegen Tri-
funktionelles Enzym, die Depots 1-3 enthalten je-
weils 3 μ g gereinigtes TFE

B: 1% (w/v) Agarose in 50 mM Natriumphosphatpuffer,
pH 7,4, 0,9% (w/v) NaCl
Der Inhalt der Depots 1-3 entspricht 24 A

C: 1% (w/v) Agarose in 10 mM Kaliumphosphatpuffer,
pH 7,4, 0,9% (w/v) NaCl
A: 3 μ g gereinigtes TFE
a: Antiserum gegen TFE

D und E: 1% (w/v) Agarose in 50 mM Tris-HCl, pH 7,4,
0,9% (w/v) NaCl

D: Das Zentraldepot (a) enthält Antiserum gegen TFE
(1:4 verdünnt)
Depot 1 und 4: 100 μ g Rohextrakt (Acetat/Ölsäure)
Depot 2 und 3: 0,5 μ g TFE
Die Präzipitinbanden wurden mit Coomassie Blue
gefärbt.

E: Das Zentraldepot (a) enthält Antiserum gegen TFE
Die Depots 1-3 enthalten je 1,3 μ g gereinigtes
TFE, das zuvor mit TCA gefällt, das Präzipitat
mit Aceton gewaschen, in 125 mM Tris-HCl, pH 7,4,
und 0,2% SDS gelöst und 10 min bei 100°C denatu-
riert wurde.

3.4.2.3 Überprüfung der Spezifität des Antiserums durch Immunoblotting

Das Trifunktionelle Enzym ließ sich in gereinigter Form als auch im Rohextrakt induzierter *N.crassa*-Hyphen durch immunspezifische Anfärbung nach Western Blotting nachweisen (Abb. 25). Jeweils nur die den Untereinheiten des TFE zuzuordnende Bande bei 93 kDa wurde hierbei gefärbt (Slot 1 und 2).

Schwache zusätzliche Anfärbungen bei 51 kDa und 46 kDa konnten in solchen Rohextrakten gezeigt werden, die erst nach längerer Zeit der Aufbewahrung bei 4°C für SDS-PAGE aufbereitet wurden (Slot 3 und 4: Rohextrakte, die nach 2 Tagen aufbereitet wurden). Die ermittelten Molekulargewichte als auch das Verhältnis der sehr schwachen Anfärbung des 51 kDa-Peptids (in den gezeigten Abbildungen kaum zu identifizieren) zum 46 kDa-Peptid weisen darauf hin, daß es sich hierbei um die primären proteolytischen Spaltprodukte des TFE handelt (vgl. hierzu 3.6.3.1).

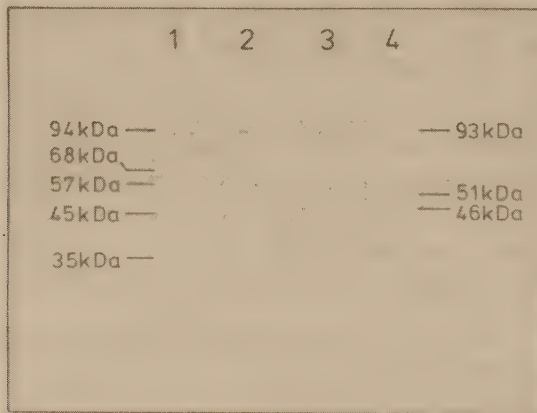


Abb. 25: Immunoblotting des Trifunktionellen Enzyms nach SDS-PAGE
Slot 1: 1 µg gereinigtes TFE
Slot 2: 70 µg Rohextrakt (24 h Acetat/Ölsäure), Aufbereitung für SDS-PAGE unmittelbar nach der Präparation des Rohextraktes
Slot 3: 35 µg Rohextrakt
Slot 4: 70 µg Rohextrakt
Der Rohextrakt aus Slot 3 und 4 wurde 2 Tage nach der Präparation für SDS-PAGE aufbereitet. Die immunspezifische Anfärbung erfolgte durch Inkubation mit Antiserum gegen TFE (1:1000). Als Markerproteine dienten Phosphorylase b (93 kDa), BSA (68 kDa), Pyruvatkinase (57 kDa), Ovalbumin (45 kDa) und LBP (35 kDa).

3.4.2.4 Immunelektrophorese des Trifunktionellen Enzyms

Die Immunelektrophorese wurde nach der Methode von Grabar und Williams (115) bei einem pH von 8,6 durchgeführt (s.2.16.3).

Wie aus Abbildung 26 ersichtlich, zeigte sich nach der elektrophoretischen Auftrennung des gereinigten TFE nur eine Präzipitinbande im Anschluß an die nachfolgend durchgeführte Diffusionsanalyse mit dem spezifischen Antiserum.

Das stark basische TFE wanderte unter diesen Bedingungen aufgrund seiner Ladung (vgl. 3.3.7) in die Richtung der Kathode.

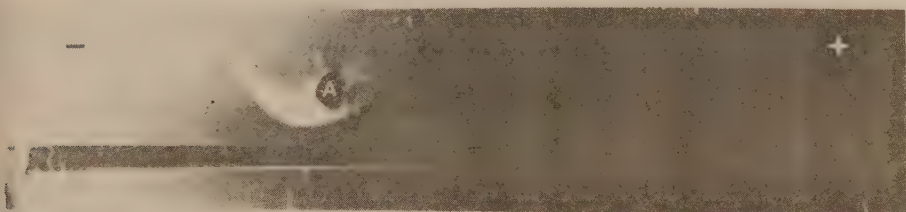


Abb. 26: Immunelektrophorese nach Grabar und Williams bei pH 8,6

Nach Auftrag von 16 μ g gereinigtem Trifunktionellem Enzym in das Depot (A) erfolgte eine 2-stündige Elektrophorese bei 10 V/cm. In die im Anschluß an die elektrophoretische Auftrennung des Proteins ausgehobene Rinne wurden 100 μ l spezifisches Antiserum angefüllt.

Die Lage von Anode (+) und Kathode (-) wurde entsprechend gekennzeichnet.

3.4.2.5 Bestimmung des Antiserumtiters durch Sewell-Titration

Die Immuntitration nach Sewell (116) zur Bestimmung des Antiserumtiters wird in Abbildung 27 gezeigt.

Annähernd keine Deflektion der Präzipitinbande erfolgte mit dem Inkubationsansatz aus Depot 5, so daß hier die Konzentration an TFE vorlag, die ausreichte, unter den gegebenen Bedingungen den Antikörperanteil des Serums vollständig abzusättigen. Der Titer des Antiserums berechnet sich hiernach auf 0,535 (mg spezifisches Antigen, die von 1 μ l Antiserum gebunden werden können).

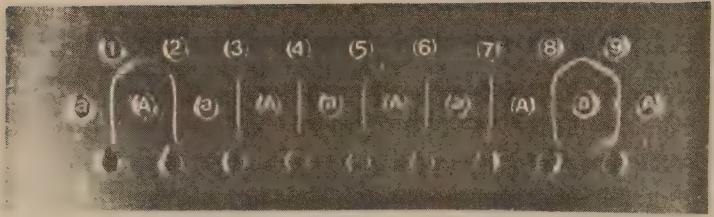


Abb. 27: Bestimmung des Antiserumtiters nach Sewell

Depot A: 0,5 μ g TFE

Depot a: Antiserum

In die Depots 1-9 wurden Inkubationsansätze, die wie unter 2.16.4.2 beschrieben vorbehandelt wurden, eingefüllt und folgend angegebene Mengen des gereinigten TFE, bezogen auf 1 μ l Antiserum, enthielten:

1: 0,027 μ g; 2: 0,107 μ g; 3: 0,268 μ g; 4: 0,401 μ g;
5: 0,535 μ g; 6: 0,803 μ g; 7: 1,07 μ g; 8: 1,338 μ g;
9: 1,605 μ g.

Die Depots der unteren Reihe wurden nicht verwendet.

3.4.2.6 Bestimmung der Enzymaktivitäten des Trifunktionellen Enzyms nach Immuntitration

Jeweils 12,2 μ g des gereinigten Trifunktionellen Enzyms wurde mit unterschiedlichen Mengen Antiserum versetzt, mit TBS auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt und anschließend 2 h bei Raumtemperatur und 17 h bei 4°C inkubiert. Nach Abzentrifugieren der Immunpräzipitate wurden die Überstände zur Bestimmung der Enzymaktivitäten von Enol-CoA Hydratase, 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase und Epimerase eingesetzt.

Abbildung 28 zeigt den Verlauf der Aktivitätskurven in Abhängigkeit von der im jeweiligen Inkubationsansatz vorhandenen Menge an Antiserum. Die Kinetiken haben einen relativ symmetrischen Verlauf; vollständige Hemmung aller Enzymaktivitäten wurde bei allen Enzymaktivitäten bei 30 μ l zugesetztem Antiserum gemessen. Die im Verlauf dieser Titrationskurve auftauchenden, relativ kleinen Abweichungen der Enzymaktivitäten im Verhältnis zueinander lassen sich möglicherweise als den jeweiligen Anteil von nicht präzipitierten, primären Immun-

komplexen interpretieren, welche das Substrat weiterhin den entsprechenden, noch unblockiert vorliegenden aktiven Zentren zugänglich lassen (was wiederum eine Folge der räumlichen Struktur des Enzyms darstellt).

Entscheidend ist jedoch, daß, wie schon erwähnt, alle Enzymaktivitäten bei der gleichen Antiserumkonzentration inhibiert werden. Dieser Punkt zeigt also aller Wahrscheinlichkeit nach die Konzentration an, bei welcher eine vollständige Präzipitation (und nicht nur Inaktivierung der Enzymaktivitäten) erfolgte, was als weiteres Kriterium zur Beurteilung der Trifunktionalität des gereinigten Enzyms herangezogen werden kann. Die Wahrscheinlichkeit nämlich, daß beim Vorliegen voneinander unabhängiger Enzyme die Antikörper gegen jedes dieser Proteine den gleichen Serumtiter für eine vollständige Präzipitation aufweisen, ist als relativ gering einzuschätzen.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde in Abbildung 28 auf die Darstellung der Aktivitäten für die mit Präimmunserum inkubierten Ansätze verzichtet. Präimmunserum bewirkte in keinem Fall eine Hemmung der Aktivitäten.

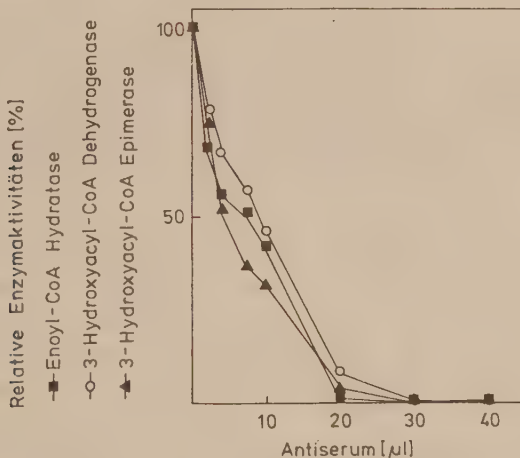


Abb. 28: Hemmung der Enzymaktivitäten des Trifunktionalen Enzyms durch Immuntitration
12,2 µg des gereinigten TFE wurden mit unterschiedlichen Mengen Antiserum inkubiert (2 h bei Raumtemperatur, 17 h bei 4°C). Die Bestimmung der Enzymaktivitäten erfolgte nach Abzentrifugation der Immunpräzipitate. Die Aktivitäten beziehen sich auf die im Ansatz ohne zugegebenes Antiserum ermittelten Werte (100%).

3.4.2.7 Immunologische Kreuzreaktionen des Trifunktionellen Enzyms aus N.crassa mit anderen β -Oxidationssystemen

Im Rahmen eines immunologischen Screenings von β -Oxidationssystemen unterschiedlicher Organismen wurden die in Tabelle 5 gezeigten Proteinproben in den jeweils angegebenen Reinigungsstufen in Immunoblotting-(B), Ouchterlony-(O) und Immuntitrationsversuche-(T) eingesetzt.

Mit der Ausnahme von Candida tropicalis konnte in keinem anderen β -Oxidationssystem eine immunologische Kreuzreaktion auf der Ebene der angewandten Methoden beobachtet werden. Das gilt für die bereits isolierten Multienzymkomplexe der β -Oxidation innerhalb der untersuchten Prokaryontengruppe (20,22,23), über die erst teilweise in filamentösen Pilzen und Hefen identifizierten β -Oxidationsproteine (22,62,128), bis hin zu den hier auch eingesetzten Enzymen aus der mitochondrialen β -Oxidation. Auch die mitochondriale Enoyl-CoA Hydratase aus N.crassa zeigt, wie sich auch aus den vorhergehenden Beschreibungen zur immunologischen Charakterisierung der beiden Proteine erkennen läßt, offenbar keine immunologisch erfaßbaren strukturellen Homologien zum TFE.

Jedoch sind bei diesem Screening die Grenzen der Nachweisbarkeit zu beachten, die sowohl im jeweiligen Serumtiter, in dem in den Präparationen vorliegenden spezifischen Proteingehalt sowie in der Sensitivität des durchgeführten Testes begründet liegen.

Das Trifunktionelle Enzym aus Candida tropicalis (128) zeigte sowohl eine immunspezifische Anfärbung bei Immunoblottingversuchen mit Antiserum gegen TFE von N.crassa sowie umgekehrt auch das Antiserum gegen C.tropicalis-TFE das Protein aus N.crassa erkannte. Auf die Besonderheiten dieser immunologischen Kreuzreaktion wird noch in 3.6.3.3.2 (vgl. Abb.39E) eingegangen.

In der Doppeldiffusionsanalyse nach Ouchterlony als auch in Immuntitrationstests, in welchen im Gegensatz zum Immunoblotting native Proteinproben verwendet wurden, konnte dagegen keine Kreuzreaktivität festgestellt werden, was die Abhängigkeit von der jeweils gewählten Untersuchungsmethode verdeutlicht.

Bakterien	Art der eingesetzten Probe	Antiserum TFE		Antiserum ¹⁻³ vs. TFE (N. crassa)
		(N. crassa) vs. Proteinprobe	(N. crassa)	
Bakterien	<i>Escherichia coli</i>	B(-)		
	<i>Pseudomonas putida</i>	B(-)		
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	B(-)		
	<i>Pseudomonas maltophilia</i>	B(-)		
	<i>Pseudomonas diminuta</i>	B(-)		
	<i>Pseudomonas cepacia</i>	B(-)		
	<i>Pseudomonas acidovorans</i>	B(-)		
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	B(-)		
	N. crassa (mitoch. Enoyl-CoA Hydratase)	B, O, T (-)		B, O, T (-) ¹
	<i>Aspergillus tamarii</i>	B(-)		
Pilze	<i>Podospora anserina</i>	B(-)		
	<i>Helminthosporium spec.</i>	B(-)		
	<i>Cladosporium resinae</i>	B(-)		
	<i>Botrytis cinerea</i>	B(-)		
	<i>Trichosporon cutaneum</i>	B, O (-)		
	<i>Hansenula polymorpha</i>	B, O (-)		
	<i>Candida tropicalis</i>	B(+)/O, T(-)		B(+)/O, T(-) ²
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	B(-)		
	<i>Pichia pastoris</i>	B(-)		
	<i>Cucumis sativus</i> (Samen)	B, O (-)		B, O (-) ³
Samenpflanzen	Rattenleber	B(-)		
	Rinderleber	B(-)		
	Schweineherz	B(-)		

I : (Partiell) gereinigtes Protein
 Ia : Enoyl-CoA Hydratase aus Mitochondrien
 Ib : 3-Hydroxyacyl-CoA DH aus Mitochondrien
 II : Rohextrakt ölsäureinduzierter Zellen
 III: Peroxisomenpräparation

1: Antiserum gegen mitochondriale Enoyl-CoA Hydratase (N. crassa)
 2: Antiserum gegen Trifunktionelles Enzym (C. tropicalis)
 3: Antiserum gegen Bifunktionelles Protein (Cuc. sativus)

B: Immunoblotting
 O: Ouchterlonytest
 T: Immunittitation
 +: Kreuzreaktion
 -: keine Kreuzreaktion

3.5 Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von β -Oxidationsenzymen

Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation der β -Oxidation in N.crassa von Kionka und Kunau (126) zeigten bereits die Verteilung von Enzymaktivitäten. Alle β -Oxidationsaktivitäten konnten in acetat- und ölsäuregewachsenen Zellen in Partikeln nachgewiesen werden, die bei einer Dichte von $1,21 \text{ g/cm}^3$ zusammen mit den Schlüsselenzymen des Glyoxylatzyklus, Isocitratlyase und Malatsynthase, sedimentierten und durch elektronenmikroskopische Untersuchungen als Microbodies identifiziert werden konnten ((140) und 3.5.3). Lediglich die Enoyl-CoA Hydrataseaktivität verteilte sich sowohl auf die glyoxysomalen als auch mitochondrialen Fraktionen, bei Zellen, die auf Saccharose als einziger Kohlenstoffquelle gewachsen waren, lediglich auf die mitochondrialen Fraktionen. Dies ergab zusammen mit der relativ hohen spezifischen Aktivität dieses Enzyms schon in saccharosegewachsenen Zellen erste Hinweise auf eine zweite konstitutive Enoyl-CoA Hydratase.

Katalase konnte in einer weiteren partikulären Fraktion bei einer Dichte von $1,26 \text{ g/cm}^3$ enzymatisch bestimmt werden.

Die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen wurden durchgeführt, um zusätzlich die Bestimmung von Enzymen, die am Abbau ungesättigter Fettsäuren beteiligt sind, vorzunehmen, um den Nachweis der Lokalisation der β -Oxidation auf molekularer Ebene mit Hilfe von spezifischen Antiseren durchzuführen, und um die Verteilung des Trifunktionellen Enzyms zwischen Membran und Matrix der glyoxysomalen Partikel zu untersuchen.

Hierzu wurden Zellen verwendet, die wie unter 2.5 beschrieben in 1 l Vorkultur mit 2% (w/v) Saccharose für 24 h gewachsen waren und dann auf 1 l Medium, das 1 mM Ölsäure-1% (w/v) Tergitol als einzige Kohlenstoffquelle enthielt, umgesetzt und weitere 12 h wachsen gelassen wurden.

Die frisch geernteten Hyphen wurden durch Mörsern mit Quarzsand aufgeschlossen (vgl. 2.6.2). Jeweils 10 ml dieses Homogenats wurden zur Trennung der Zellorganellen einer isopyknischen Zentrifugation im Saccharosegradienten unterworfen (2.7).

3.5.1 Auftrennung von Zellorganellen im Saccharosedichte- gradienten

Zur Trennung der Zellorganellen wurde jeweils 10 ml Rohextrakt (ca. 50 mg Protein) von ölsäuregewachsenen Hyphen (2.6.2) auf einen 30-60%igen Saccharosedichtegradienten geschichtet und einer isopyknischen Zentrifugation unterworfen (2.7).

Die Verteilung der gemessenen Enzymaktivitäten nach erfolgter Zentrifugation und Fraktionierung wird in Abbildung 28 gezeigt.

Es konnten deutlich voneinander getrennte Aktivitätspeaks ermittelt werden, deren Verteilung im Gradienten den von Kionka (103) ermittelten Werten entspricht. Während die β -Oxidationsenzyme zusammen mit der Isocitratlyase, einem Schlüsselenzym des Glyoxylatzyklus, bei einer Dichte von $1,21 \text{ g/cm}^3$ sedimentierten, ließen sich Fumarase als mitochondriales Leitenzym bei $1,19 \text{ g/cm}^3$ und Katalase bei $1,26 \text{ g/cm}^3$ nachweisen.

Zusätzlich wurden hier auch Enzymaktivitäten, die am Abbau ungesättigter Fettsäuren beteiligt sind, gemessen. 3-Hydroxyacyl-CoA Epimerase, als Bestandteil des Trifunktionellen Enzyms, und 3-cis,2-trans-Enoyl-CoA Isomerase cosedimentierten ebenfalls mit den Partikeln, welche die β -Oxidationsenzyme und die Isocitratlyase enthalten.

Diese Partikel wurden durch elektronenmikroskopische Untersuchungen eindeutig als Microbodies identifiziert ((140) und 3.5.3), welche zur Vereinfachung der Nomenklatur im Folgenden als Glyoxysomen bezeichnet werden.

Eine Ausnahme unter den β -Oxidationsenzymen stellte die Enoyl-CoA Hydrataseaktivität dar, die sich außerdem auch in den mitochondrialen Fraktionen nachweisen ließ.

Katalase wurde in Partikeln bei einer Dichte von $1,26 \text{ g/cm}^3$ deutlich von der Isocitratlyase getrennt nachgewiesen. Theimer et al. konnten in Zellen der slime-Mutante von N.crassa, die auf Acetat gewachsen war, ebenfalls eine Abtrennung der Katalase von den Glyoxylatzykclusenzymen nachweisen, und vermuteten, daß es sich hierbei um einen zweiten Microbodytyp handelte (104,105). Ein solcher Nachweis gelangt in dem Wildtyp von N.crassa bisher nicht.

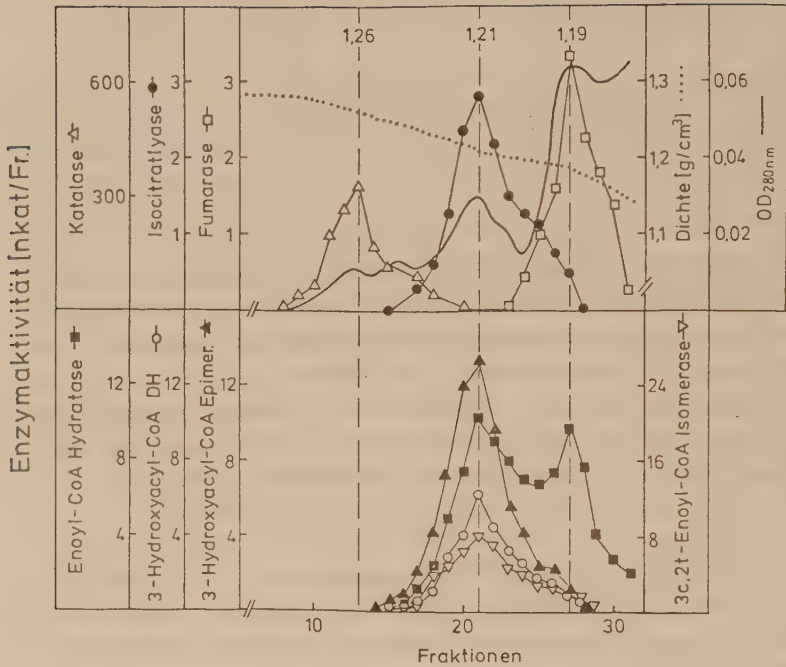


Abb. 28: Verteilung der Enzymaktivitäten in einem 30-60% Saccharosedichtegradienten

Die Auftrennung der Zellorganellen erfolgte nach Überscheidung mit einem Rohextrakt aus ölsäureinduzierten Myzelien und anschließender Zentrifugation im Vertikalrotor (90 min, 48.000 g). Die Fraktionen der löslichen Enzyme im oberen Bereich des Gradienten (Überstand) wurden in der Abbildung ausgelassen.

Abbildung 29A zeigt die gelelektrophoretische Analyse des Saccharosegradienten. Zusätzlich wurden hier die Fraktionen des Überstandes des Gradienten mitberücksichtigt, die in Abbildung 28 aus Gründen der Übersichtlichkeit vernachlässigt wurden. Ein beträchtlicher Anteil der gemessenen Enzymaktivitäten (20-40%) konnten auch in diesen Fraktionen bestimmt werden, und war im wesentlichen von den Aufschlußbedingungen (Intensität der mechanischen Kräfte, Dauer des Aufschlusses) abhängig, was darauf hindeutet, daß die löslichen Anteile der

Enzymaktivitäten das Ausmaß der Zerstörung von Zellorganellen widerspiegelt.

Eine Veränderung der Proteinzusammensetzung in fortlaufender Reihenfolge der Fraktionen ist deutlich erkennbar. Die Fraktion des Aktivitätsmaximums der Katalase (Fraktion 13) weist dem Profil des Aktivitätspeaks folgend nur noch wenige angefärbte Proteinbanden auf. Das dominante Protein dieser Fraktionen liegt bei 21 kDa.

Die genaue Position der in Abbildung 29A durch Pfeile gekennzeichneten Banden des TFE (93 kDa) und der mitochondrialen Enoyl-CoA Hydratase (31 kDa) wurde durch elektrophoretischen Vergleich mit den jeweils gereinigten Proteinen ermittelt (wird nicht gezeigt).

In den in Abbildung 29 B-D gezeigten Ausschnitten handelt es sich um Immunoblots, die mit den entsprechenden spezifischen Antisera gegen gereinigtes Trifunktionelles Enzym, gereinigte (mitochondriale) Enoyl-CoA Hydratase und Katalase aus Neurospora crassa in den Fraktionen des Gradienten durchgeführt wurden.

Die durch ELISA (2.16.2) angefärbten Banden geben Aufschluß über die Verteilung der Enzyme im Saccharosedichtegradienten. Die Banden des TFE verteilen sich über die durch das Leitenzym Isocitratlyase bestimmten glyoxysomalen Fraktionen (Abb. 29B). Ein kleiner Anteil kann auch noch in den mitochondrialen Fraktionen immundetektiert werden. Wie auch aus Abbildung 28 ersichtlich, ist das durch eine partielle Verunreinigung der mitochondrialen Fraktionen durch Glyoxysomen erklärbar. Dieser Sachverhalt begründet sich vermutlich aus den unter diesen Versuchsbedingungen gewählten großen Auftragsmengen bei einem kleinen Saccharosegradientenvolumen, die darauf abzielten, eine möglichst große Glyoxysomenausbeute zu erhalten, und gleichzeitig Katalase im Gradienten lokalisieren zu können, die unter den gewählten Wachstumsbedingungen eine nur relativ geringe Enzymaktivität in den Gradientenfraktionen besitzt. Interessant ist die Tatsache, daß ein beträchtlicher Teil der löslichen Anteile der Enzymaktivitäten des Trifunktionellen Enzyms in den Fraktionen 33 und 34 des Saccharosegradienten

nachgewiesen werden konnte (wird nicht gezeigt). Diese Fraktionen bildeten bei der Zentrifugation die Grenzschicht des Auftrags zum eigentlichen Saccharosegradienten. Nach erfolgter Zentrifugation waren in dieser Interphase visuell deutlich partikuläre Bestandteile zu erkennen. Auch im Immunoblot sind vorwiegend in diesen Fraktionen des Überstandes spezifische Anfärbungen zu erkennen (Abb. 29B). Das Proteinpattern in SDS-PAGE (Abb. 29A) zeigt hier ebenfalls ein zum restlichen Überstand verändertes Muster. Eine mögliche Erklärung für die erhöhten TFE-Aktivitäten in diesen Fraktionen wäre, daß sich hier zerstörte und/oder aggregierte Glyoxysomen mit einem großen Membrananteil angesammelt haben, während der größte Teil der Organellenmatrix in den löslichen Teil des Überstandes gelangte. Die Erklärung wird gestützt durch die Untersuchungen zur Membranständigkeit des Enzyms (vgl. 3.5.2). Isocitratlyase und 3-cis,2-trans-Enoyl-CoA Isomerase dagegen waren im Überstand hauptsächlich in den höherliegenden Fraktionen nachweisbar.

Beim Auftrag größerer Proteinmengen in SDS-PAGE waren im Immunblot neben der 93 kDa-Bande des TFE manchmal auch noch weitere Banden schwach angefärbt (wird nicht gezeigt). Nach ihrer elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit (51 kDa, 48 kDa und 46 kDa) handelt es sich hierbei vermutlich um proteolytische Fragmente des TFE (vgl. 2.6.3).

Das zweite Protein, welches Enoyl-CoA Hydrataseaktivität besitzt, ließ sich im ELISA nach Western Blotting (Abb. 29C) dem Elutionsprofil der Fumarase folgend (Abb. 28) in den mitochondrialen Fraktionen des Saccharosedichtegradienten nachweisen.

In Abbildung 29D wird außerdem ein Immunblot der Katalase gezeigt. Das Antiserum der Katalase richtet sich gegen das gereinigte Protein aus N. crassa, welches in SDS-PAGE ein Molekulargewicht von 80 kDa aufweist (141). Das Immunblot zeigt die Anfärbung der 80 kDa-Untereinheit der Katalase lediglich in den Fraktionen des Überstandes. In den partikulären Fraktionen, in welchen Katalaseaktivität bestimmt wurde, konnte keine immunochemische Anfärbung erhalten werden, sowie auch in

SDS-PAGE (Abb. 29A) keine coomassiegefärbte Bande bei 80 kDa unter diesen Bedingungen lokalisiert werden konnte. Eine Erklärung hierfür könnte sein, daß die Katalase hier in Mengen vorliegt, die unterhalb der Nachweisgrenze von Coomassie-Färbung und ELISA liegen. Auch die Anwesenheit von zwei immunologisch nicht miteinander kreuzreagierenden Isoenzymen wäre denkbar, jedoch fehlen hier weitere Hinweise auf eine zweite konstitutive Katalase.

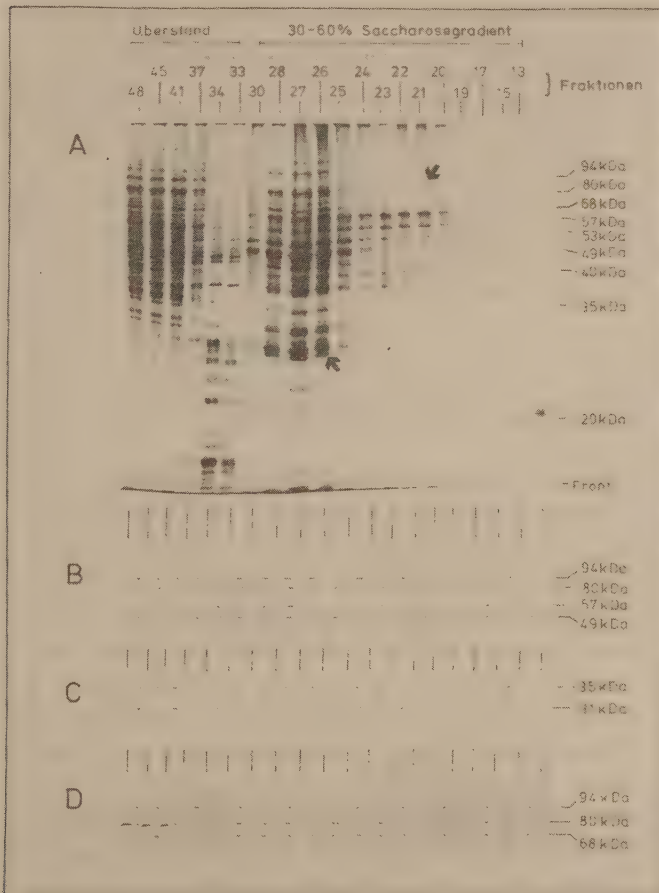


Abb. 29

Abb. 29: Gelelektrophoretische Analyse der Saccharosedichtegradientenfraktionen (vgl. Abb. 28) durch SDS-PAGE (A) und Immunblot der Fraktionen nach elektrophoretischem Transfer auf Nitrocellulose (B-D)

A: 12% SDS-PAGE der Gradientenfraktionen.

Um vergleichende Analyse zu ermöglichen, wurden jeweils 100 µl der Gradientenfraktionen zur Gelelektrophorese aufgearbeitet, das entsprach 4 µg für Fr. 13, 15 µg für Fr. 21, 60 µg für Fr. 27 und 50 µg für Fr. 48.

Die Anfärbung erfolgte mit Coomassie Blue.

Die Pfeile zeigen die Position des TFE bei 93 kDa und der mitochondrialen Enoyl-CoA Hydratase bei 31 kDa an.

B-D: Immunblot der in A gezeigten Fraktionen.

Immunspezifische Detektion mit:

B: Antiserum gegen Trifunktionelles Enzym (1:500)

C: Antiserum gegen mitochondriale Enoyl-CoA Hydratase (1:500)

D: Antiserum gegen Katalase (1:500)

Die Positionen der Markerproteine sind durch Striche markiert: Phosphorylase b (94 kDa), Transferrin (80 kDa), BSA (68 kDa), Pyruvatkinase (57 kDa), Glutamat-DH (53 kDa), Fumarase (49 kDa), Aldolase (40 kDa), LDH (35 kDa) und Trypsininhibitor (20 kDa).

3.5.2 Osmotischer Aufschluß der Glyoxysomen

Mit dem Ziel, das Ausmaß der Bindung des Trifunktionellen Enzyms an die Organellenmembran festzustellen, wurden Glyoxysomen osmotisch aufgeschlossen.

Hierzu fanden solche glyoxysomalen Fraktionen eines Saccharosedichtegradienten Verwendung, die eine Dichte von 1,21 g/cm³ und mehr aufwiesen (vgl. Abb. 28), um Kontaminationen durch Mitochondrien möglichst gering zu halten. Die Abtrennung der Membranen vom Matrixanteil der durch osmotischen Schock aufgeschlossenen Glyoxysomen sowie die Aufarbeitung der Membranfraktionen wird in 2.8 beschrieben.

Tabelle 6 gibt Auskunft über die Verteilung der Enzymaktivitäten des Trifunktionellen Enzyms und der Isocitratlyase als Leitenzym des Glyoxylatzyklus zwischen dem Membranprotein- und Matrixproteinanteil. Als Matrixproteinanteil wurde der durch Ultrazentrifugation nach osmotischer Schockbehandlung nicht sedimentierbare Anteil der Enzymaktivitäten berechnet.

Tabelle 6: Verteilung der Enzymaktivitäten des Trifunktionellen Enzyms und der Isocitratlyase zwischen Membran und Matrix der Glyoxysomen aus N. crassa nach osmotischer Schockbehandlung

	Enoyl-CoA Hydratase		3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase		3-Hydroxyacyl-CoA Epimerase		Isocitrat- lyase	
	Gesamt- aktiv- tät	Anteil	Gesamt- aktiv- tät	Anteil	Gesamt- aktiv- tät	Anteil	Gesamt- aktiv- tät	Anteil
	nkat	%	nkat	%	nkat	%	nkat	%
Matrix- Fraktion	5,40	31	3,22	37	7,07	51	1,54	93
Membran- Fraktion	12,55	69	5,45	63	6,89	49	0,12	7

Als Ausgangsmaterial diente eine glyoxysomale Fraktion eines Saccharosedichtegradienten, deren mitochondriale Kontamination möglichst gering war (Dichte $\geq 1,21$ g/cm³).

Während die Isocitratlyaseaktivität vollständig in der Matrixfraktion nachweisbar war, konnte ein überwiegender Teil der Enzymaktivitäten des TFE in der Membranfraktion bestimmt werden. Die Werte des Epimeraseanteils jedoch weichen von den Werten der Enoyl-CoA Hydratase und 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase ab, was sich vermutlich auf die relativ geringen Meßwerte der Epimerase in der Membranfraktion zurückführen läßt. Das Verhältnis der Enzymaktivitäten der Enoyl-CoA Hydratase zur Epimerase weist hier einen ungewöhnlich hohen Wert von 1,82 auf, im Vergleich zum Verhältnis der Enzymaktivitäten von 0,85 gemessen mit gereinigtem TFE (s. Tabelle 2), was auf einen spezifischen Verlust von Epimeraseaktivität im Verlauf der Aufarbeitung hinweist.

Fujiki et al. (142) konnten in Rattenleberperoxisomen durch gelelektrophoretische Analyse zeigen, daß die Herauslösung von Matrixproteinen und peripheren Membranproteinen durch Behandlung der Peroxisomen mit Natriumbicarbonat bei pH 11 effektiver erscheint als die in dieser Arbeit angewandte Methode. Zur Bestimmung des meßbaren Anteils der Enzymaktivitäten ist die Na_2CO_3 -Methode jedoch aufgrund ihres hoch im basischen Bereich liegenden pH-Wertes als kritisch zu bewerten.

Die für das Trifunktionelle Enzym gefundenen Werte in der Membranfraktion repräsentierten somit vermutlich den Anteil des Proteins, mit dem es unter den gegebenen Bedingungen als peripheres Membranprotein in den Glyoxysomen vorliegt ((143), zur Definition der Membranproteine s. (144)).

3.5.3 Immunocytochemischer Nachweis des Trifunktionellen Enzyms

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden von Herrn Dr. M. Veenhuis, Universität Groningen, Niederlande, durchgeführt.

Ölsäuregewachsene Hyphen von N.crassa wurden in Lowicryl eingebettet. Anschließend wurden Ultradünnschnitte dieses Materials angefertigt, die dann mit Antiserum gegen natives Trifunktionelles Enzym inkubiert wurden. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte durch elektronenmikroskopischen Nachweis von Protein A-Goldpartikeln, die zur Markierung der Immunkomplexe dienten.

Durch Serienschnitte konnte gezeigt werden, daß alle in der Zelle befindlichen Microbodies markiert waren, und daher vermutlich keine unterschiedlichen Microbodypopulationen vorlagen.

Abbildung 30 ist ein typischer Ausschnitt des elektronenmikroskopischen Bildes. Goldpartikeln zeigten sich sowohl in der inneren als auch in der peripheren Matrix der meisten Microbodies. Die immunocytochemischen Untersuchungen bestätigen somit offensichtlich die zuvor beschriebene Verteilung des TFE zwischen Matrix- und Membranfraktion nach osmotischer Schockbehandlung (3.5.2). Kontrollinkubationen mit dem Serum nicht-immunisierter Kaninchen wurden durchgeführt und zeigten keine Protein A-Goldmarkierung (wird nicht gezeigt).

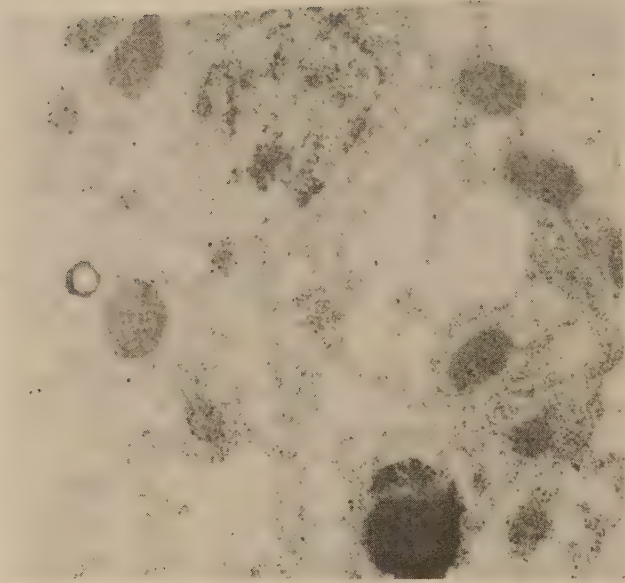


Abb. 30: Immunocytochemischer Nachweis des Trifunktionellen Enzyms

Ultradünnschnitte von ölsäuregewachsenen Hyphen von *N. crassa* wurden nach ihrer Einbettung in Lowicryl mit Antiserum gegen natives TFE inkubiert, die Immunkomplexe mit Protein A-Gold markiert.

3.6 Untersuchungen zur strukturellen Organisation des Trifunktionellen Enzyms

3.6.1 Bestimmung der Aminosäurekomposition

Die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung wurde mit der in 2.23.1 beschriebenen Methode durchgeführt. Hierzu wurden von insgesamt etwa 350 µg zuvor über reverse-phase PHLC gereinigtem Trifunktionelles Enzym jeweils Dreifachbestimmungen zu unterschiedlichen Hydrolysezeiten (24, 48 und 72 h) durchgeführt.

Es wurde ein Molekulargewicht von 93.000 Da und eine Kettenlänge von 809 Aminosäuren (mit einem mittleren Molekulargewicht von 115 Da) der Untereinheit des TFE zugrundegelegt. Die Aminosäuren Tryptophan und Cystein sind mit der angewendeten Hydrolysetechnik nicht nachweisbar; die Aminosäuren Asparagin und Glutamin werden je als Summe mit den Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure erfaßt, da die jeweiligen Hydrolyseprodukte identisch sind. Die Standardabweichungen für die einzelnen Aminosäuren liegen bei Anwendung der beschriebenen Methode bei maximal 10% (145).

Tabelle 7 zeigt die Aminosäurekomposition des Trifunktionellen Enzyms. Glycin und Alanin sind hierbei die überwiegenden Aminosäuren, während die schwefelhaltige Aminosäure Methionin nur in geringen Mengen enthalten ist.

Tabelle 7: Aminosäurezusammensetzung des Trifunktionellen Enzyms

Aminosäuren	Code	Mole der Aminosäure pro Mol des TFE ^a
Asparaginsäure oder Asparagin	B	56,6 ^b
Threonin	T	48,2 ^c
Serin	S	40,5 ^c
Glutaminsäure oder Glutamin	Z	58,7 ^b
Prolin	P	47,8
Glycin	G	93,0
Alanin	A	91,9
Valin	V	77,0 ^d
Methionin	M	7,9 ^e
Isoleucin	I	48,5 ^d
Leucin	L	59,4
Tyrosin	Y	27,2 ^c
Phenylalanin	F	43,0
Lysin	K	61,1 ^c
Histidin	H	13,6
Arginin	R	34,6

^a Alle Werte sind, soweit nicht anders angezeigt, Durchschnittswerte der Hydrolyse nach 24,48 und 72 h.

^b Werte nach 24 h Hydrolyse

^c Extrapolierte Werte (0 h Hydrolyse)

^d Extrapolierte Werte (100 h Hydrolyse)

^e Werte nach 72 h Hydrolyse

Den Berechnungen wurde ein relatives Molekulargewicht von 93 kDa der Untereinheit des TFE zugrundegelegt. Cystein und Tryptophan konnten nach dieser Methode (vgl. 2.23.1) nicht bestimmt werden.

3.6.2 Aminoterminaler Sequenzanalyse des Trifunktionellen Enzyms

Vor der aminoterminalen Sequenzanalyse wurden 370 µg zu ca. 95% gereinigtes Trifunktionelles Enzym über reverse-phase HPLC aufgetrennt (Abbildung 31). Das Chromatogramm ergab einen einzigen Peak des Trifunktionellen Enzyms, der fraktionierte aufgefangen und in SDS-PAGE überprüft wurde (wird nicht gezeigt). Die anschließend automatisch in einem Applied Biosystems Gasphasensequenzator durchgeführte Sequenzanalyse ergab keine erkennbaren PTH-Aminosäuren über dem in Vorläufen gezeigten Background nach mehreren Zyklen des Edman-Abbaus. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, daß das Protein offensichtlich einen blockierten Aminoterminus besitzt, dessen chemische Struktur nicht weiter untersucht wurde.

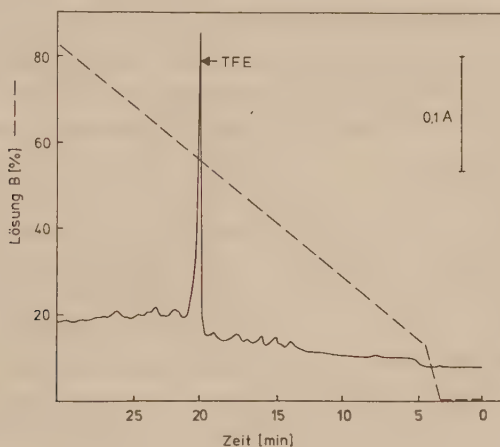


Abb. 31: Reverse-phase HPLC des Trifunktionellen Enzyms

370 µg zu ca. 95% gereinigtes TFE wurde bei 0% Lösung B eine 5 µm Vydac C₁₈-Säule (4,6 x 180 mm) gegeben. Die Durchflußrate betrug 1 ml/min, die programmierten Gradientenbedingungen werden angezeigt. Die Absorption wurde bei 214 nm gemessen. Die Lösungen des Gradienten hatten folgende Zusammensetzung:

Lösung A: 0,1% Trifluoressigsäure in Wasser
Lösung B: 0,08% Trifluoressigsäure in 84% Acetonitril/
16% Wasser

3.6.3 Limitierte Proteolyse des Trifunktionellen Enzyms

3.6.3.1 Limitierte Proteolyse des nativen Trifunktionellen Enzyms

Die in den folgenden Abschnitten durchgeführten Proteolysen wurden nach den im Methodenteil unter 2.15.1 beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Hierbei wirkten die jeweils eingesetzten Proteasekonzentrationen, der verwendete Proteolyse-puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 2 mM EDTA), die gewählte Temperatur (4°C) sowie die Inkubationszeit (3 h) als limitierenden Bedingungen.

Zur Proteolyse wurden die in der folgenden Tabelle aufgeführten Proteasen mit unterschiedlicher Spezifität eingesetzt:

Tabelle 8: Übersicht über die zur limitierten Proteolyse verwendeten Proteasen

Protease	Spezifität ¹
Staphylococcus aureus V8-Protease	Glu, Asp
Trypsin	Arg, Lys
α -Chymotrypsin	Tyr, Trp, Phe, Leu, Met
Elastase	ungeladen, nichtaromatisch

¹Spaltung an der Carboxylseite der angegebenen Aminosäuren

3.6.3.1.1 Limitierte Proteolyse mit Trypsin

Zur limitierten Proteolyse des nativen TFE mit Trypsin wurden zwanzig Inkubationsansätze mit jeweils 30 µg zuvor gegen Proteolysepuffer (s. 2.15.1) dialysiertem, gereinigtem TFE eingesetzt.

Zu jedem dieser Ansätze wurde TPCK-behandeltes Trypsin in einer Konzentration zwischen 0,1 - 100 µg/mg TFE zugegeben und 3 h bei 4°C inkubiert. Danach wurde mit Trypsininhibitor (10 µg/µg Trypsin) abgestoppt, und jeweils ein Aliquot zur Bestimmung der Enzymaktivitäten des TFE, ein anderes Aliquot zur Probenaufbereitung für SDS-PAGE eingesetzt.

Abbildung 32 zeigt die gelelektrophoretische Analyse der einzelnen Inkubationsansätze, welche das unter diesen Bedingungen spezifische Fragmentierungsmuster für das TFE wiedergibt.

Abgesehen von einigen nur in geringen Mengen vorliegenden, schwach anfärbbaren Spaltprodukten konnten in diesen Verdauungsansätzen fünf dominante Fragmente erkannt werden: bei 51 kDa (T 51), bei 48 kDa (T 48), bei 46 kDa (T 33) und bei 26 kDa (T 26). Bei einer Konzentration von 10 µg Trypsin/mg TFE war die 93 kDa-Bande der unverdauten Untereinheit des TFE hier nicht mehr anfärbbar.

Der Verlauf des sequentiellen Auftauchens der einzelnen Proteinfragmente in Abhängigkeit zur eingesetzten Proteasekonzentration machte eine Einteilung in primäre Spaltprodukte, die direkt aus der 93 kDa-Untereinheit des TFE erzeugt wurden, gegenüber sekundären Spaltprodukten, die wiederum aus Proteinfragmenten hervorgingen, wahrscheinlich. Als verhältnismäßig dominante Fragmente bei geringen Trypsinkonzentrationen wurden T 51 und T 46 bestimmt, wobei sich jedoch T 51 als relativ stabiler gegenüber Proteaseeinwirkung erweist als vergleichsweise T 46. Mit zunehmender Trypsinkonzentration vergrößert sich der Anteil der restlichen Fragmente, wobei jedoch T 33 bei Trypsinkonzentrationen größer als ca. 12 µg/mg TFE wieder abnimmt.

Auf weitere Analysen der einzelnen Fragmente aus tryptischer Verdauung mit immunologischen Methoden (3.6.3.3) sowie der N-terminalen Sequenzanalyse (3.6.3.5) wird an anderer Stelle eingegangen.

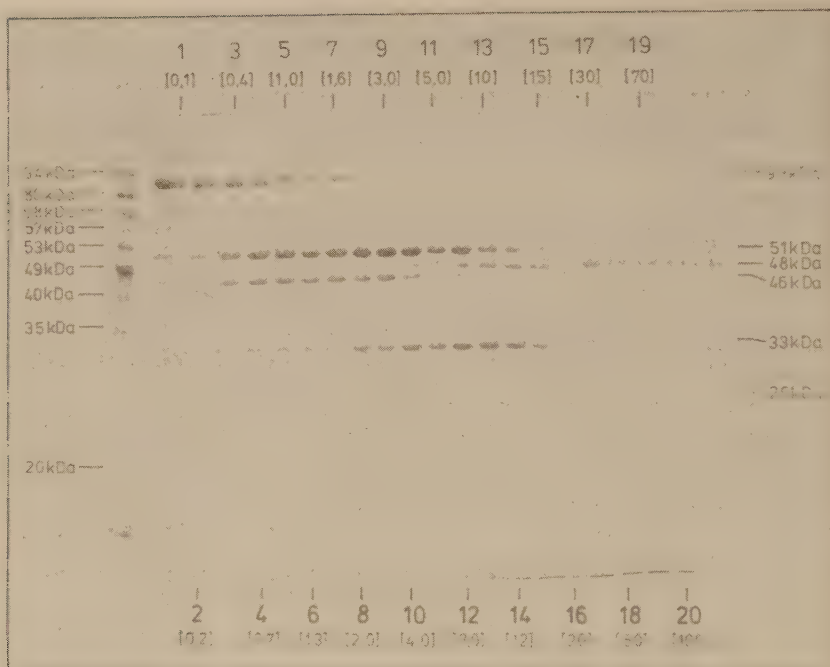


Abb. 32: Analyse der tryptischen Fragmente des Trifunktionellen Enzyms durch 12% SDS-PAGE

Jeweils 30 µg natives, gereinigtes TFE wurde wie unter 2.15.1 beschrieben mit unterschiedlichen Mengen von TPCK-behandeltem Trypsin versetzt, und nach 3stündiger Inkubation bei 4°C wurde ein Aliquot aus jedem der 20 Ansätze für SDS-PAGE aufbereitet.

Die in den eckigen Klammern unter den Slotnummern eingefügten Werte zeigen die jeweilig eingesetzte Menge Trypsin in µg pro mg TFE.

Jeder Slot enthielt 7 µg Protein. Die Anfärbung erfolgte mit Coomassie Blue.

Als Markerproteine (in den äußeren Slots) wurden Phosphorylase b (94 kDa), Transferrin (80 kDa), BSA (68 kDa), Pyruvatkinase (57 kDa), Glutamatdehydrogenase (53 kDa), Fumarase (49 kDa), Aldolase (40 kDa), LDH (35 kDa) und Trypsininhibitor (20 kDa) verwendet.

Abbildung 33 zeigt die den jeweiligen Ansätzen, die über SDS-PAGE aufgetrennt wurden (Abb. 32), entsprechenden Bestimmungen der Enzymaktivitäten des Trifunktionellen Enzyms, die zu einem kinetischen Verlauf in doppelt-reziproker Darstellung zusammengefaßt wurden.

Während sich der kinetische Verlauf der Enoyl-CoA Hydralase- und 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenaseaktivitäten ungefähr entsprechen, weicht die Epimerasekinetik signifikant davon ab. Die Epimerase wird mit steigenden Trypsinkonzentrationen stärker inaktiviert als die beiden anderen Aktivitäten.

Bei einer Konzentration von 10 µg Trypsin/mg TFE bei welcher in SDS-PAGE die 93 kDa-Bande des TFE gerade nicht mehr anfärbbar war, wurden jedoch noch ca. 30% der Ausgangsaktivität (bezogen auf das nicht proteolysierte Protein) von Enoyl-CoA Hydratase sowie 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase, und noch ca. 10% der Epimeraseaktivität gemessen. Auch bei höheren Konzentrationen an Trypsin war noch Enzymaktivität meßbar.

Die dargelegten Ergebnisse geben somit Hinweise auf das Vorliegen von Verdauungsfragmenten des TFE, die noch enzymatische Aktivität besitzen.

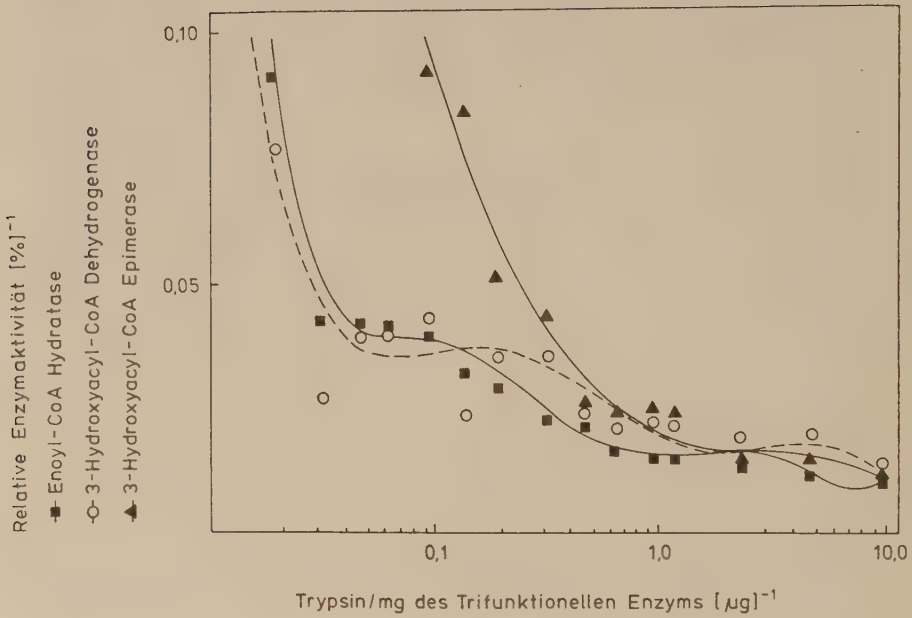


Abb. 33: Verlauf der Inaktivierung der Enzymaktivitäten des Trifunktionellen Enzyms in Abhängigkeit zur eingesetzten Trypsinkonzentration

In 20 verschiedenen Ansätzen wurden jeweils 30 μg gereinigtes TFE wie unter 2.15.1 beschrieben mit unterschiedlichen Mengen von TPCK-behandeltem Trypsin versetzt. Nach 3 h Inkubation bei 4°C wurde ein Aliquot der einzelnen Ansätze in die Enzymtests eingesetzt.

Die Berechnung der Kurvenverläufe erfolgte durch Regression der Werte nach Gauß-Polynomen 5-ter (Epimerase) und 6-ter Ordnung (Enoyl-CoA Hydratase und 3-Hydroxyacyl-CoA DH)

3.6.3.1.2 Limitierte Proteolyse mit Chymotrypsin, V8-Protease und Elastase

Natives Trifunktionelles Protein wurde wie unter 2.15.1 beschrieben vorbehandelt und zur limitierten Proteolyse mit TLCK-behandeltem Chymotrypsin (Abbildung 33), *Staphylococcus aureus* V8-Protease (Abbildung 34) und Elastase (Abbildung 35) eingesetzt.

Die Abbildungen 33 bis 35 zeigen jeweils die gelelektrophoretische Analyse der erhaltenen Fragmente durch SDS-PAGE. Auch durch diese Proteasen werden definierte Spaltprodukte in Abhängigkeit zur eingesetzten Konzentration erzeugt. Die so erhaltenen Fragmente ähneln in ihrem Molekulargewicht sowie in ihrer von der Konzentration der eingesetzten Protease abhängigen (zeitlichen) Entstehung den Hauptspaltprodukten T 51 bis T 33 aus der tryptischen Verdauung (s. Abb. 32). Lediglich die Proteolyse mit Elastase erzeugt in bestimmten Konzentrationsverhältnissen einige zusätzliche Fragmente.

Die Messung der Enzymaktivitäten (hier nicht gezeigt) ergab einen ähnlichen Inaktivierungsverlauf der einzelnen Enzymaktivitäten des TFE, wie es Abbildung 33 für die Trypsinverdauung zeigt. Die Epimeraseaktivität wurde im Vergleich zur Enoyl-CoA Hydratase- und 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenaseaktivität bei steigenden Proteasekonzentrationen schneller inaktiviert. Jedoch mußte in Relation zum Trypsin in jedem Fall eine wesentlich größere Menge Protease zur Inaktivierung der TFE-Aktivitäten eingesetzt werden sowie zur Erzeugung der spezifischen Fragmentierung, wie aus SDS-PAGE ersichtlich wird.

Diese Versuchsergebnisse geben einen Hinweis darauf, daß die Proteolysen im wesentlichen an durch die Konformation bedingten, exponierten Stellen des TFE stattfinden, welche die bevorzugten Spaltstellen an der vorliegenden Polypeptidkette darstellen.

Abb. 33 12% SDS-PAGE der Spaltprodukte des Trifunktionellen
- 35: Enzyms nach limitierter Proteolyse

Natives gereinigtes TFE wurde wie unter 2.15.1 beschrieben mit unterschiedlichen Mengen der jeweiligen Protease versetzt. Nach 3 h Inkubation bei 4°C wurden die Proben für 12% SDS-PAGE aufbereitet.

Die in die eckigen Klammern unter den Slotnummern eingefügten Werte zeigen die jeweilig eingesetzte Menge Protease in µg pro mg TFE an.

Als Markerproteine wurden Phosphorylase b (94 kDa), Transferrin (80 kDa), BSA (68 kDa), Pyruvatkinase (57 kDa), Glutamatdehydrogenase (53 kDa), Fumarase (49 kDa), Aldolase (40 kDa), LDH (35 kDa) und Trypsin-inhibitor verwendet.

Zur Färbung der Gele wurde Coomassie Blue verwendet.

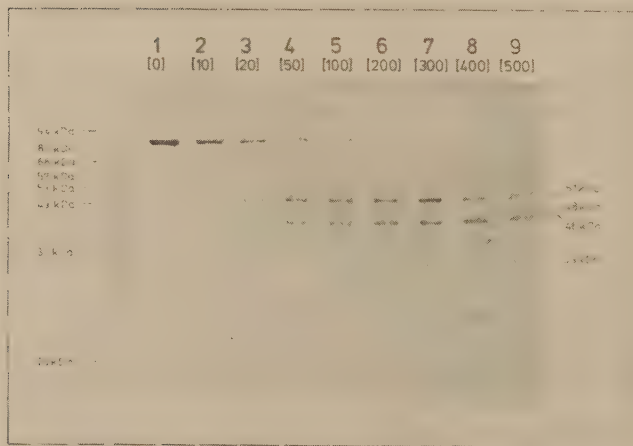


Abb. 33: Limitierte Proteolyse mit Chymotrypsin (TLCK-behandelt)
Jeder Slot enthielt 8,2 µg TFE.

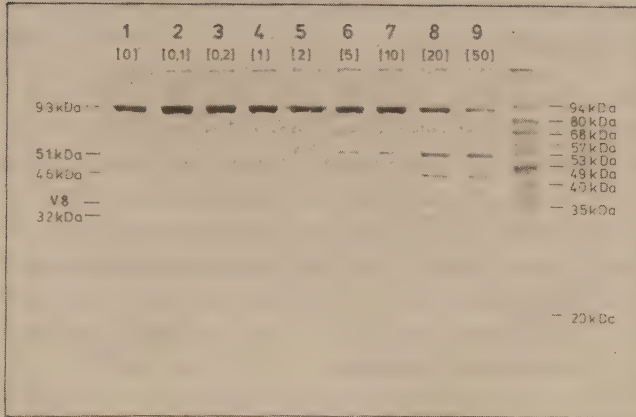


Abb. 34: Limitierte Proteolyse mit *Staphylococcus aureus* V8-Protease

Jeder Slot enthielt 13,5 µg TFE.
Die der V8-Protease zuzuordnende Bande ist entsprechend gekennzeichnet.

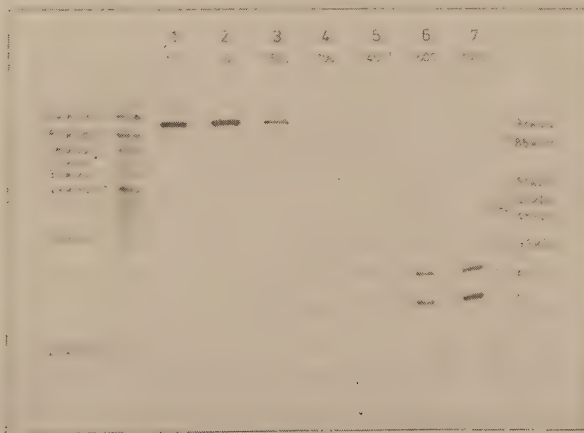


Abb. 35: Limitierte Proteolyse mit Elastase
Jeder Slot enthielt 13 µg TFE.
Die mit E gekennzeichneten Banden stammten aus der käuflich erworbenen Elastasepräparation.

3.6.3.1.3 Vergleich der proteolytischen Fragmente aus Verdauungsansätzen mit unterschiedlichen Proteasen

Ein direkter gelelektrophoretischer Vergleich von proteolytischen Spaltprodukten des Trifunktionellen Enzyms unter Verwendung von unterschiedlichen Proteasen wird in Abbildung 36 gezeigt. Hierbei fanden jeweils solche Konzentrationen an Protease Verwendung, die hauptsächlich einen Vergleich der im Bereich von 46 - 51 kDa liegenden Fragmente zuließen. Die Abbildung zeigt außerdem die mit einigen Proben durchgeführte immunspezifische Anfärbung mit Antiserum gegen natives TFE aus N.crassa im Immunblotting.

Die Peptidketten der proteolytischen Hauptspaltprodukte weisen unabhängig von der jeweiligen Spezifität der eingesetzten Protease das gleiche oder zumindest ähnliche Molekulargewicht von 51 bzw. 46 kDa auf. Bei chymotryptischer und Elastase-Spaltung scheint sich die 46 kDa-Bande in eine Doppelbande aufzuteilen, die sich vermutlich auf zwei nahe nebeneinanderliegende Spaltstellen in der Polypeptidkette des Trifunktionellen Enzyms zurückführen läßt.

Auch die "endogener Proteolyse" (Slot 1-3) unterliegenden Proben des TFE zeigen die charakteristischen Fragmente bei 51 und 46 kDa, außerdem, wie bei der tryptischen Verdauung, ein 33 kDa-Fragment. Unter "endogener Proteolyse" soll die Spaltung des gereinigten TFE während einer mehrmonatigen Lagerung der Proteinlösung bei 4°C verstanden werden. Das TFE erwies sich in gereinigter Form als ein gegenüber Einfrier- und Auftauprozessen (Präzipitation) sowie der Aufbewahrung in glycerinhaltigen Puffern (Inaktivierung der Enzymaktivitäten) sehr empfindliches Protein. Unter vielen erprobten Aufbewahrungsbedingungen erwies sich die Lagerung in 0,15 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, dem Gradientenpuffer des letzten säulenchromatographischen Reinigungsschrittes, bei 4°C als günstig. Die Proteinlösung des TFE war so i.a. für mindestens 6 Wochen stabil. Die mit der Zeit in einigen Fällen auftretende Spaltung der 93 kDa-Proteinbande des TFE ist vermutlich auf Proteolyse durch mikrobielle Kontamination zurückzuführen. Zu-

sätzlich zu den bereits erwähnten Spaltprodukten trat in diesen gezeigten (jedoch nicht in allen) Proben, die endogener Proteolyse unterlagen, ein dominantes 61 kDa-Fragment auf.

Die Slots 2, 5, 8, 11 und 14 der Abbildung zeigen die immun-spezifische Anfärbung der Proteinfragmente aus Verdauung mit unterschiedlichen Proteasen. Ein Vergleich mit den Coomassie Blue-gefärbten Gelbanden zeigt, daß das Antiserum gegen natives TFE alle Gelbanden erkennt, jedoch erscheint das Verhältnis der Intensität der immun-spezifischen Anfärbung der einzelnen Proteinbanden gegenüber der Proteinfärbung der einzelnen Fragmente ein anderes zu sein. So wird die 46 kDa-Bande in jedem Fall stärker immun-spezifisch gefärbt als im Vergleich die 51 kDa-Bande.

Auf die immunologische Charakterisierung der Fragmente aus tryptischer Verdauung wird noch in 3.6.3.3 eingegangen.

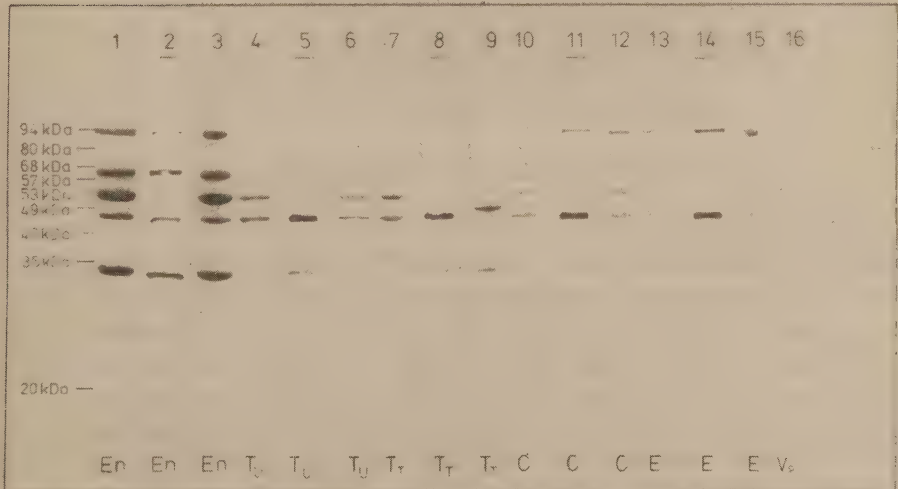


Abb. 36

Abb. 36: Vergleich der proteolytischen Spaltprodukte aus Verdauungsansätzen mit unterschiedlichen Proteasen durch SDS-PAGE und Immunoblotting

Slot 1,3,4,6,7,9,10,12,13,15 und 16: 12% SDS-PAGE, Coomassie Blue-Färbung

Slot 2,5,8,11,14: Immunoblotting nach 12% SDS-PAGE, Immunspezifische Färbung mit Antiserum gegen natives TFE (1:1000)

Jeder Slot enthielt 5 µg Protein, ausgenommen Slot 1-3 mit jeweils 20 µg Protein.

Unterhalb jedes Slots wird die Art der verwendeten Protease angezeigt. Die nachfolgend erwähnten Mengenangaben in eckigen Klammern bezeichnen die jeweilig eingesetzte Menge an spezifischer Protease in µg, bezogen auf 1 mg TFE:

T_U: unbehandeltes Trypsin [5 µg/mg]

T_T: TPCK-behandeltes Trypsin [20 µg/mg]

C : Chymotrypsin [100 µg/mg]

E : Elastase [100 µg/mg]

V8: V8-Protease [100 µg/mg]

Die Proteolysen wurden wie unter 2.15.1 beschrieben für 3 h bei 4° durchgeführt.

In die mit En bezeichneten Slots 1-3 wurden Proben von gereinigtem TFE aufgetragen, die 9 Monate bei 4°C aufbewahrt wurden und "endogener Proteolyse" (s.3.6.3.1.3) unterlagen.

Markerproteine: vgl. Abb. 33-35.

3.6.3.2 Limitierte Proteolyse von denaturiertem Trifunktionellen Enzym und Fragmenten aus der Trypsinverdauung

Jeweils 20 µg gereinigtes Trifunktionelles Enzym wurde wie unter 2.15.2 beschrieben gefällt, in wenig 125 mM Tris-HCl, pH 6,8, mit 0,5% (w/v) SDS und 10% (v/v) Glycerin aufgenommen und hitzedenaturiert. Den denaturierten TFE-Proben wurden unterschiedliche Trypsinmengen (von 0,01 bis 0,5 µg Trypsin) zugegeben, und die Ansätze wurden dann für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurden die Proteolysen durch Zugabe von 10% (v/v) 2-Mercaptoethanol und 2% (w/v) SDS und erneuter Hitzedenaturierung abgestoppt.

Abbildung 37 zeigt die Auftrennung der Proteinfragmente in SDS-PAGE. Das unter diesen Bedingungen erhaltene Spaltmuster

ist ein anderes im Vergleich zur Proteolyse mit nativem TFE (3.6.3.1.1); besonders im niedrigen Molekulargewichtsbereich wird ein komplizierter erscheinendes Fragmentierungsmuster erhalten.

Dieser Vergleich verdeutlicht die Vermutung, daß, wie schon in 3.6.3.1.2 erwähnt, die Proteolyse des nativen TFE bevorzugt an konformationsbedingt exponierten Spaltstellen des Polypeptids stattfindet. Durch die Denaturierung des Proteins werden dieser Annahme folgend somit neue Spaltstellen freigelegt.

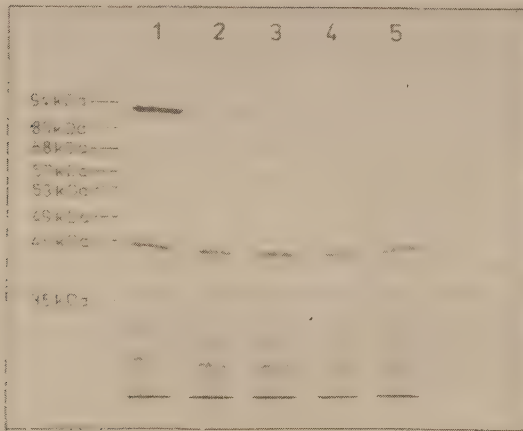


Abb. 37: Limitierte Proteolyse von denaturiertem Trifunktionellen Enzym

Jeweils 20 µg gereinigtes TFE wurde wie unter 2.15.2 beschrieben vorbehandelt, mit unterschiedlichen Mengen Trypsin versetzt (s.u.) und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben in 10% SDS-PAGE (2 mm) aufgetrennt.

Zu 20 µg TFE wurden folgende Trypsinmengen zugegeben:

1: 0,01 µg; 2: 0,05 µg; 3: 0,1 µg; 4: 0,2 µg;

5: 0,5 µg

Als Markerproteine wurden Phosphorylase b (94 kDa), Transferrin (80 kDa), BSA (68 kDa), Pyruvatkinase (57 kDa), Glutamatdehydrogenase (53 kDa), Fumarase (49 kDa), Ovalbumin (45 kDa) und LDH (35 kDa) verwendet. Die Anfärbung erfolgte mit Coomassie Blue.

Abbildung 38 zeigt die limitierte Proteolyse der proteolytischen Fragmente, die aus tryptischer Verdauung des nativen TFE und Auftrennung dieser Proben über SDS-PAGE erhalten wurden, nach der von Cleveland et al. (113) beschriebenen Methode (2.15.3) mit Trypsin. Dieser Versuchsansatz wurde gewählt, um die sequentielle Entstehung der primären und sekundären Spaltprodukte zu untersuchen. Jedoch erwies sich diese Methode hierfür aus folgenden Gründen als ungeeignet: Erstens zeigten sich die meisten Proteinfragmente auch nach Einsatz hoher Trypsinkonzentrationen als relativ resistent gegenüber proteolytischem Angriff. Nur durch Erhöhung der Sensitivität der Methode durch immunspezifische Anfärbung mit Antiserum gegen natives TFE konnten einige sekundäre Spaltprodukte erkannt werden. Zweitens, wie schon erwähnt, treten durch die Denaturierung neue Spaltstellen in den Peptidketten der Fragmente auf, so daß die Fragmentierungsmuster nicht mehr mit denen des nativen Moleküls übereinstimmen.

Aus diesem Grund wurden zur weiteren Charakterisierung der Struktur des TFE immunologische Methoden (3.6.3.3) und N-terminale Sequenzierung der Fragmente aus Trypsinverdauung (3.6.3.5) gewählt.

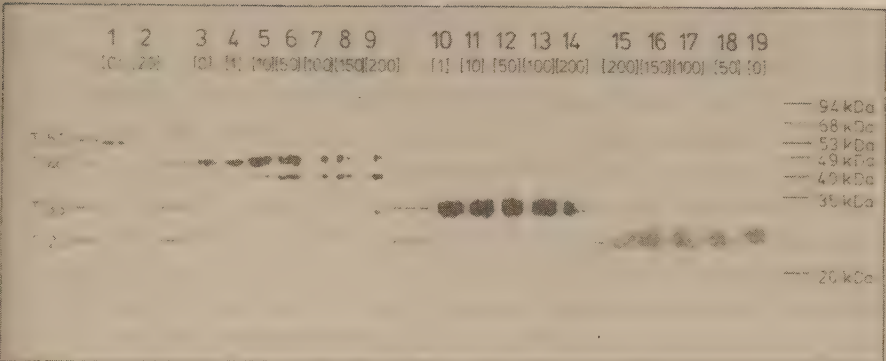


Abb. 38: Limitierte Proteolyse von Fragmenten aus Trypsin-verdauung nach Cleveland (113)

Gelbanden, die jeweils etwa zwischen 5 und 10 µg Protein enthielten, wurden wie unter 2.15.3 beschrieben einer zweiten SDS-Gelelektrophorese (12%) unter Zusatz von Trypsin unterworfen. Die limitierte Proteolyse fand für 30 min nach Einwandern der Proteinproben an der Trenngelgrenze statt.

Die in Klammern angegebenen Werte unter den Slotnummern geben die jeweils zugesetzten Trypsinmengen in µg an.

In die einzelnen Slots wurden folgende Proteinproben aus Verdauungsansätzen des nativen TFE nach Methode 2.15.1, die als coomassiegefärbte Proteinbanden nach SDS-PAGE ausgeschnitten wurden, aufgetragen:

Slot 1 und 2: T 51

Slot 3 - 9: T 46

Slot 10 - 14: T 33

Slot 15 - 19: T 26

Die Detektion der proteolytischen Spaltprodukte erfolgte durch immunspezifische Anfärbung mit Antiserum gegen natives TFE (1:1000) nach Western Blotting.

Phosphorylase b (94 kDa), BSA (68 kDa), Glutamatdehydrogenase (53 kDa), Fumarase (49 kDa), Aldolase (40 kDa), LDH (35 kDa) und Trypsininhibitor (20 kDa) dienten als Molekulargewichtsmarker.

3.6.3.3 Immunologische Charakterisierung der Fragmente des Trifunktionellen Enzyms aus tryptischer Verdauung

3.6.3.3.1 Gewinnung von Antiseren gegen proteolytische Fragmente des Trifunktionellen Enzyms

Zur Gewinnung von spezifischen Antiseren gegen proteolytische Fragmente des TFE aus Trypsinverdauung wurde jeweils 1 mg des nativen TFE mit 10 µg des TPCK-behandelten Trypsins versetzt, und eine limitierte Proteolyse für 3 h bei 4°C, wie unter 2.15.1 beschrieben, durchgeführt. Die Proteolyse wurde durch Fällung mit TCA gestoppt.

Anschließend wurde eine präparative SDS-PAGE (12%/4 mm) durchgeführt, um die proteolytischen Fragmente zu trennen. Die gefärbten Gelbanden der 48 kDa(T 48), 33 kDa-(T 33) und 26 kDa-(T 26)-Fragmente wurden, wie unter 2.16.1.2 beschrieben, mit Hilfe eines Skalpells ausgeschnitten, gegen PBS äquilibriert und nach Homogenisierung in CFA subcutan in Kaninchen injiziert. Im Abstand von 2-3 Wochen wurden vier Boosterinjektionen durchgeführt. Jede Injektion enthielt etwa 200 µg des jeweiligen Fragments.

7 Tage nach dem letzten Booster wurde den Kaninchen unter Narkose durch Herzpunktion Blut entnommen.

Die Antiseren gegen T 48, T 33 und T 26 werden in den folgenden Abschnitten zur Vereinfachung mit anti-T 48, anti-T 33 bzw. anti-T 26, das Antiserum gegen natives TFE (vgl. 3.4.2.1) mit anti-TFE benannt.

3.6.3.3.2 Immunoblotting der proteolytischen Fragmente des Trifunktionellen Enzyms mit unterschiedlichen Antiseren

In 3.6.3.1.3 (Abbildung 36) wurde bereits hervorgehoben, daß die Intensität der immunspezifischen Anfärbung der proteolytischen Fragmente des TFE mit Antiserum gegen natives (anti-TFE) im Vergleich zur Proteinfärbung unterschiedlich war.

Abbildung 39A zeigt ein Immunoblotting einer Reihe von proteolytisiertem TFE mit unterschiedlichen Trypsinkonzentrationen gegen anti-TFE. Diese Ansätze sind jeweils ein Aliquot der in 3.6.3.1.1 beschriebenen und entsprechen genau den in Abb. 32 über SDS-PAGE aufgetrennten Proben, so daß ein direkter Vergleich der Proteinmuster möglich ist.

Durch anti-TFE wurden prinzipiell alle tryptischen Fragmente erkannt, die auch mit Coomassie Blue anfärbbar waren, jedoch unterscheidet sich, wie bereits erwähnt, die Intensität der immunspezifischen Anfärbung von der Proteinfärbung. Hierbei wurden von den Hauptspaltprodukten T 51 und T 48 weitaus schlechter gefärbt als die übrigen Fragmente bzw. die 93 kDa-Untereinheit des TFE. Da es gerechtfertigt scheint, die Intensität dieser Anfärbungen als ein ungefähres Maß für den Titer eines spezifischen Antiserums zu verwenden, weil sie in direkter Beziehung zu der Menge an gebundenen, peroxidasekonjugierten zweiten Antikörper (goat-anti-rabbit IgG) steht, ist offenbar die Konzentration der Antikörperspezies, die die beiden Hauptfragmente erkennen, im Verhältnis zu den restlichen spezifischen Antikörpern im Serum relativ gering.

Die immunspezifischen Anfärbungen mit den Antiseren, die gegen die proteolytischen Fragmente des TFE gewonnen wurden, werden in Abbildung 39 B-D gezeigt. Auch hier wurden wieder die gleichen Ansätze aus der tryptischen Verdauung des TFE aus 3.6.3.1.1 verwendet.

Im Immunblotting mit anti-T 48 (Abbildung 39B) wurden von den Hauptspaltprodukten nur T 51 und T 48 erkannt, und folgerichtig wurde auch die 93 kDa-Bande des unverdauten TFE immunspezifisch angefärbt, da es gemeinsam antigene Determinanten mit den Spaltprodukten tragen muß.

Anti-T 33 und anti-T 26 (Abb. 39 C und D) unterscheiden sich in Bezug auf die Erkennung von Hauptspaltprodukten des TFE nicht. Diese Antiseren vermögen die 93 kDa-Bande des TFE sowie die Fragmente T 46, T 33 und T 26 neben einigen weiteren Spaltprodukten, die nur in geringeren Konzentrationen vorliegen, zu erkennen.

Zusätzlich zu den Antiseren, die gegen das N.crassa-Protein gerichtet sind, wurden die gleichen Proben auch mit Antiserum gegen das TFE aus Candida tropicalis durch Immunblotting angefärbt. Auf das Vorliegen einer immunologischen Kreuzreaktion zwischen den Proteinen beider Organismen wurde schon in 3.4.2.7 hingewiesen. Die Besonderheit dieser immunologischen Kreuzreaktion zeigt sich in Abbildung 39E. Außer der 93 kDa-Untereinheit des TFE aus N.crassa wurden lediglich das T 51- und T 48-Fragment mit dem Antiserum gegen das C.tropicalis-Protein immunspezifisch angefärbt. Umgekehrt erkennt nur anti-T 48 die 102 kDa-Bande des TFE von C.tropicalis durch Immunblotting, anti-T 33 und anti-T 26 dagegen nicht (wird nicht gezeigt). Sequenz- bzw. Strukturhomologien der beiden Trifunktionellen Enzyme scheinen sich nach immunologischen Kriterien demnach nur auf definierte Bereiche der Proteine zu beschränken.

Tabelle 9 faßt den durch Immunblotting gefundenen immunologischen Nachweis einzelner proteolytischer Fragmente des TFE mit verschiedenen Antiseren zusammen:

Tabelle 9: Nachweis von proteolytischen Fragmenten des Trifunktionellen Enzyms von N.crassa aus tryptischer Verdauung mit unterschiedlichen Antiseren durch Immunblotting

	anti-TFE N.crassa	anti-T 48	anti-T 33	anti-T 26	anti-TFE C.tropicalis
93 kDa	+	+	+	+	+
T 51	+	+	-	-	+
T 48	+	+	-	-	+
T 46	+	-	+	+	-
T 33	+	-	+	+	-
T 26	+	-	+	+	-

+: immunspezifische Anfärbung

-: keine immunspezifische Anfärbung

Eine immunspezifische Anfärbung mit den Antiseren, die gegen einen Teilbereich des TFE gerichtet sind, ist nur bei solchen Fragmenten zu erwarten, die gemeinsame antigene Determinanten tragen. Tabelle 9 verdeutlicht, daß durch die Wahl von lediglich zwei Antiseren gegen proteolytische Fragmente die Gesamtheit der in der tryptischen Verdauung auftretenden Spaltprodukte erfaßt werden kann. Zusammengekommen mit der Betrachtung des sequentiellen Verlaufs der Proteolyse (vgl. Abb. 32), bei welcher zunächst vorwiegend die Fragmente T 51 und T 46 gebildet werden, wird die Aufspaltung in zwei primäre, direkt aus der 93 kDa-Bande entstehende Spaltprodukte wahrscheinlich gemacht.

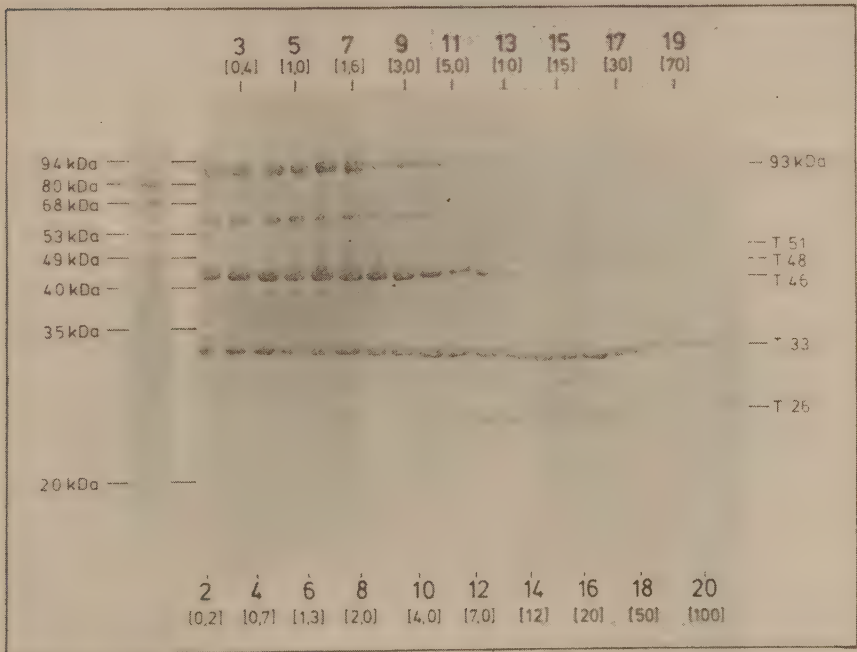


Abb. 39A:

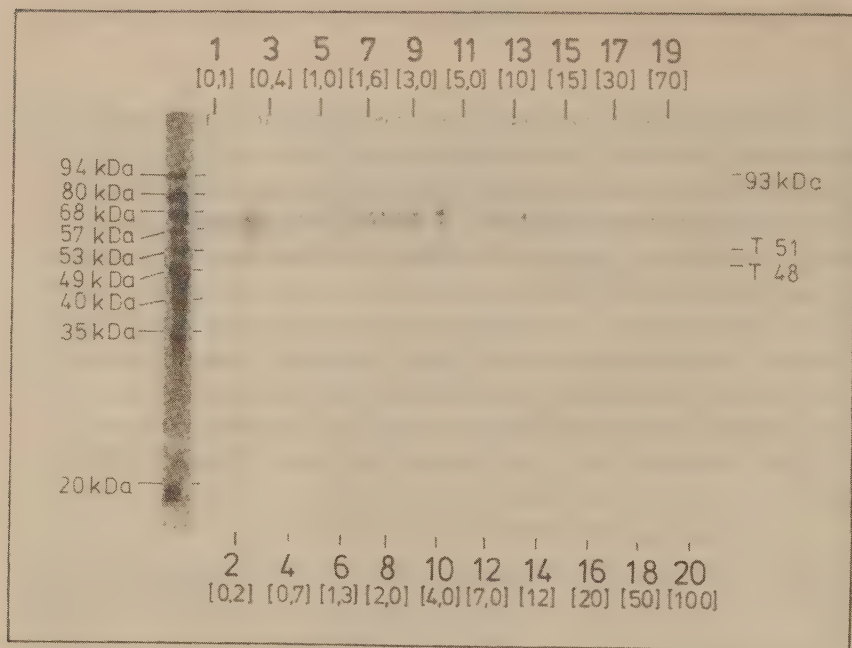


Abb. 39B:

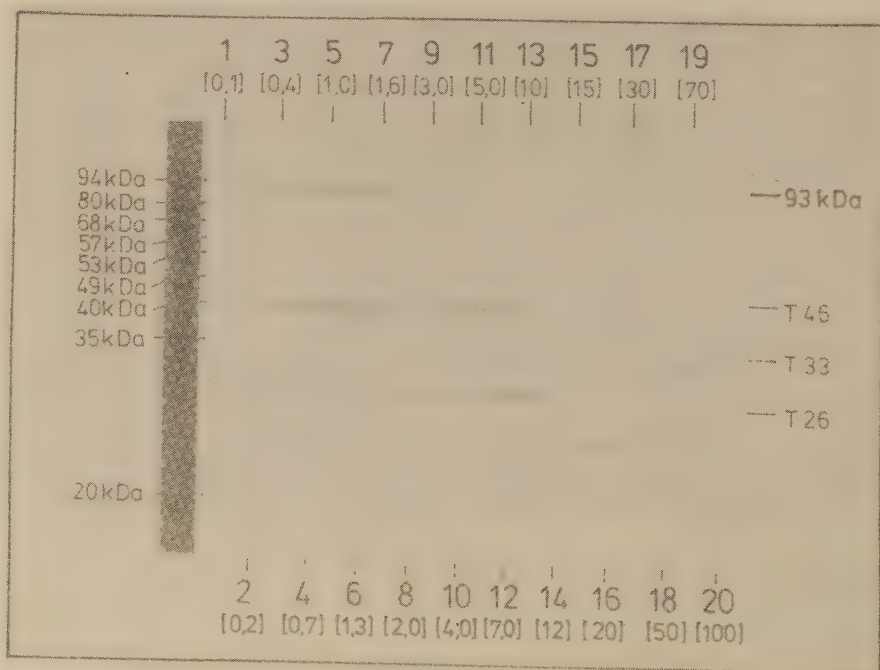


Abb. 39C:

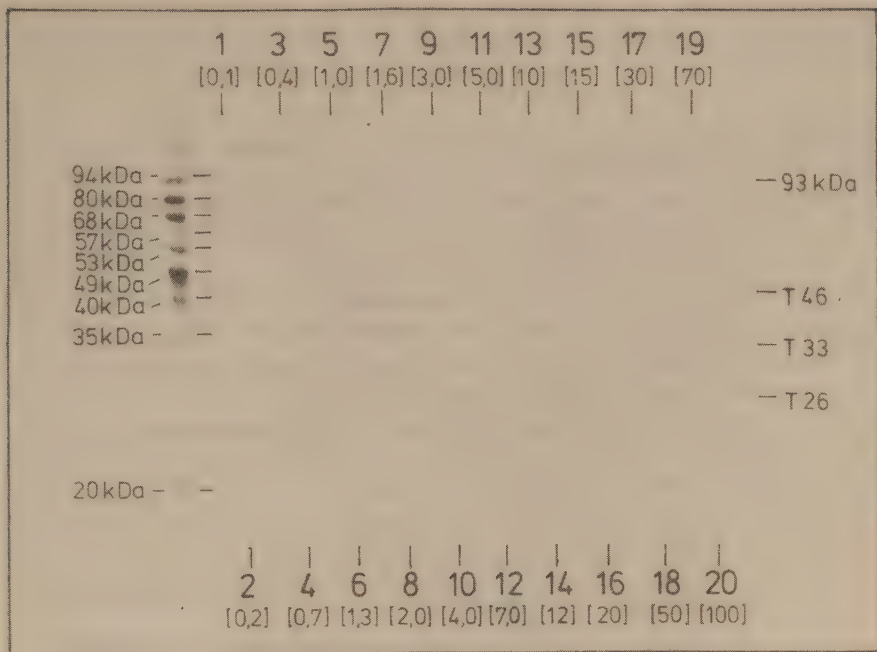


Abb. 39D:



Abb. 39E:

Abb. 39: Immunoblotting der tryptischen Fragmente des Tri-funktionellen Enzyms

TFE wurde wie unter 2.15.1 beschrieben mit den in den eckigen Klammern unter den Slotnummern gezeigten Konzentrationen ($\mu\text{g}/\text{mg}$ TFE) TPCK-behandelten Trypsins versetzt und 3 h bei 4°C inkubiert.

Jeder Slot enthielt $7\ \mu\text{g}$ Protein.

Der Auftrag jedes Slots entspricht den in Abbildung 32 gezeigten Proben.

Es wurde nach Western Blotting immunspezifisch mit den angegebenen Antiseren angefärbt:

A: immunspezifische Anfärbung mit Antiserum gegen natives TFE (1:1000) aus N.crassa

B: immunspezifische Anfärbung mit anti-T 48 (1:100)

C: immunspezifische Anfärbung mit anti-T 33 (1:400)

D: immunspezifische Anfärbung mit anti-T 26 (1:200)

E: immunspezifische Anfärbung mit Antiserum gegen TFE aus C.tropicalis (1:500)

Als Markerproteine wurden Phosphorylase b (94 kDa), Transferrin (80 kDa), BSA (68 kDa), Pyruvatkinase (57 kDa), Glutamatdehydrogenase (53 kDa), Fumarase (49 kDa), Aldolase (40 kDa), LDH (35 kDa) und Trypsin-inhibitor (20 kDa) verwendet, die mit Amidoschwarz angefärbt wurden.

3.6.3.3.3 Immunoblotting der proteolytischen Fragmente des Trifunktionellen Enzyms mit affinitätsgereinigten Antikörpern

Durch Affinitätsreinigung konnten, wie in 2.16.7 beschrieben, Antikörper, die jeweils gegen das T 48-, T 33- sowie T 26-Fragment aus tryptischer Verdauung des nativen TFE gerichtet waren, aus dem Antiserum gegen das native TFE angereichert werden. Hierzu wurden nach Bindung von 0,5 g der proteolytischen Fragmente an Nitrocellulose durch Western Blotting, Absättigen der Nitrocellulose durch BSA und anschließender Inkubation mit anti-TFE (1:50) die den Fragmentbanden entsprechenden Bereiche der Folie ausgeschnitten (mit Hilfe eines amidoschwarzgefärbten Markerstreifens, auf dem sich eine Probe des gleichen Verdauungsansatzes befand), und die an die Fragmente gebundenen Antikörper getrennt durch Elution mit 0,2 M Glycin-HCl, pH 2,8, abgelöst werden.

Diese Antikörperfraktionen, die zuvor 1:1 mit TBS/1% (v/v) Tween 20 verdünnt werden, wurden in einem ELISA nach Western Blotting von proteolytischen TFE-Proben (50 µg Trypsin/mg TFE) eingesetzt.

Abbildung 40 zeigt das Immunoblotting dieser Proben, bei welchem jeweils die Antikörperfraktionen gegen T 48, T 33 und T 26 zur immunspezifischen Färbung eingesetzt wurden. Von den in der proteolysierten TFE-Probe auftauchenden Hauptfragmenten erkennt die Antikörperfraktion gegen T 48 nur das entsprechende Fragment, während gleichzeitig sowohl T 33 als auch T 26 von den affinitätsgereinigten Antikörpern gegen T 33 und T 26 erkannt werden.

Die Ergebnisse zeigen, daß es ebenso möglich ist, aus einem Gemisch verschiedener Antikörperspezies des Serums gezielt solche Spezies zu isolieren, die gegen einen bestimmten Teil des Proteins gerichtet sind. Die immunspezifischen Anfärbungen stehen in guter Übereinstimmung mit den schon zuvor in 3.6.3.3.2 erläuterten Ergebnissen, die zeigen, daß T 33 und T 26 gemeinsame antigene Determinanten besitzen müssen und sich strukturell vom T 48-Fragment, das offensichtlich einen anderen Bereich des TFE repräsentiert, unterscheiden.

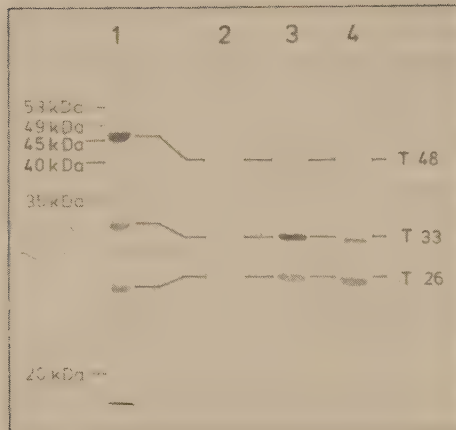


Abb. 40: Immunoblotting von proteolytischen Fragmenten des Trifunktionellen Proteins mit affinitätsgereinigten Antikörpern

0,5 mg TFE wurde mit 25 µg Trypsin (TPCK-behandelt) wie unter 2.15.1 beschrieben proteolysiert. Aus diesem Ansatz wurde wie in 2.16.7 beschrieben eine Affinitätsreinigung von Antikörpern aus Antiserum gegen natives TFE durchgeführt. Durch Elution mit eiskaltem 0,2 M Glycin-HCl, pH 2,8, konnten von Nitrocellulosestreifen spezifische Antikörper gegen T 48, T 33 und T 26 angereichert werden. Diese Antikörperfraktionen wurden nach 1:1-Verdünnung in TBS/0,1% Tween 20 zum Immunoblotting eingesetzt (Slot 2-4), zu welchem jeweils die in Slot 1 gezeigte Proteinprobe aufgetragen war.

Slot 1: 12% SDS-PAGE von 7 µg TFE nach Proteolyse mit 50 µg Trypsin/mg TFE, Coomassie Blue-Färbung

Slot 2-4: immunspezifische Anfärbung der Probe aus Slot 1 nach Western Blotting mit affinitätsgereinigten Antikörpern gegen proteolytische Fragmente aus Antiserum gegen natives TFE

Slot 2: Antikörper gegen T 48

Slot 3: Antikörper gegen T 33

Slot 4: Antikörper gegen T 26

Als Markerproteine dienten Glutamatdehydrogenase (53 kDa), Fumarase (49 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Aldolase (40 kDa), LDH 35 kDa) und Trypsininhibitor (20 kDa).

3.6.3.3.4 Doppeldiffusionsanalyse nach Ouchterlony

Abbildung 41 zeigt eine Doppeldiffusionsanalyse nach Ouchterlony, bei welcher gereinigtes TFE sowie trypsinverdautes TFE gegen Antiserum gegen natives TFE, anti-T 26, anti-T 33 und anti-T 48 aufgetragen wurde.

Lediglich das Antiserum gegen natives TFE reagierte mit den trypsinbehandelten Proben, was zeigt, daß das proteolysierte Protein wichtige dreidimensionale Strukturen mit dem intakten Protein gemeinsam haben muß (vgl. auch 3.6.3.4). Die Antiseren gegen die proteolytischen Fragmente dagegen erkannten weder das proteolysierte noch das native TFE. Die gleichen Ergebnisse wurden auch mit unterschiedlichen Verdünnungsreihen von Seren und Antigenen bzw. auch nach Proteinfärbung der Agaroseplatten erhalten.

Als Erklärungsmöglichkeit für das Ausbleiben der Immunpräzipitation bei den Antiseren gegen proteolytische Fragmente könnte die Tatsache dienen, daß diese durch Immunisierung mit denaturierten Proteinproben (s. 3.6.3.3.1) gewonnen wurden, so daß die im Ouchterlonytest nativ vorliegenden Proteine konformationsbedingt vermutlich nur wenige antigene Determinanten gegenüber den Antiseren aufweisen.

Die Antiseren gegen die proteolytischen Fragmente wurden außerdem in Immuntitrationsen zur direkten Immunpräzipitation des nativen TFE bzw. seiner proteolytischen Spaltprodukte eingesetzt (wird nicht gezeigt). Mit keinem dieser Seren konnte eine Hemmung von Enzymaktivitäten des TFE festgestellt werden, so daß die Ausbildung von Immunpräzipitaten unwahrscheinlich erscheint, und dieses einen weiteren Hinweis auf die vermutlich konformationsabhängige Antigen-Antikörper-Reaktion bietet.

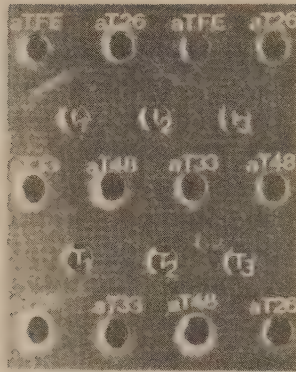


Abb. 41: Doppeldiffusionsanalyse nach Ouchterlony

aTfE: Antiserum gegen natives TFE

aT 26, aT 33, aT 48: Antiserum gegen die proteolytischen Fragmente T 26, T 33, T 48

T₁₋₃: 1 µg gereinigtes TFE, 1:1, 1:2, 1:3 verdünnt

t₁₋₃: 1 µg proteolysiertes TFE (5 µg Trypsin/mg TFE, nach Methode 2.15.1), 1:1, 1:2, 1:3 verdünnt

3.6.3.4 Versuche zur Isolierung enzymatisch aktiver Fragmente des proteolytischen Trifunktionellen Enzyms

Unterschiedliche säulenchromatographische Methoden wurden angewendet, um die Möglichkeit der Isolierung enzymatisch aktiver Fragmente des proteolysierten TFE zu untersuchen.

Abbildung 42 zeigt die Auftrennung der Spaltprodukte des TFE im Anschluß an limitierte Proteolyse mit 10 µg Trypsin/mg TFE durch Affinitätschromatographie an NAD-Agarose. Die Bindung der aufgetragenen Proteinprobe war vollständig. Keines der Fragmente konnte biospezifisch mit NAD eluiert werden, während eine Elution sämtlicher enzymatischer Aktivitäten des TFE mit identischem Elutionsprofil durch Erhöhung der Ionenstärke mit einem Tris-Gradienten gelang (Abb. 42A). Durch SDS-PAGE konnte gezeigt werden, daß alle im Auftrag befind-

lichen Proteinfragmente in den gleichen Fraktionen des Eluats wiedergefunden wurden (Abb. 42B).

Die Auftrennung der Spaltprodukte des TFE nach tryptischer Verdauung mit 5 µg Trypsin/mg TFE durch Gelfiltration an Sephacryl S-300 wird in Abbildung 43 gezeigt. Auch hier konnten die proteolytischen Spaltprodukte des TFE nicht voneinander getrennt werden. Das Elutionsvolumen entsprach hierbei dem des nativen, unbehandelten Trifunktionellen Enzyms, welches zum Vergleich der Molekulargewichte in einem Vorlauf einer Gelfiltration unterzogen wurde.

Entsprechende Versuche mit tryptischen Verdauungsansätzen wurden auch mit Kationenaustauschchromatographie an P-11, "dye-ligand"-Chromatographie an Blue Sepharose CL-6B sowie Gelfiltration in Gegenwart von Detergens durchgeführt, jedoch gelang in keinem dieser Fälle die Trennung der Fragmente voneinander.

Diese Versuche, welche auch die Ähnlichkeit der Bindungseigenschaften von proteolysiertem und unverdaulichem TFE zeigen, verdeutlichen, daß die proteolytischen Spaltprodukte unter nativen Bedingungen miteinander verbunden bleiben, und die Tertiär- und Quartärstruktur des TFE weitgehend erhalten bleibt.

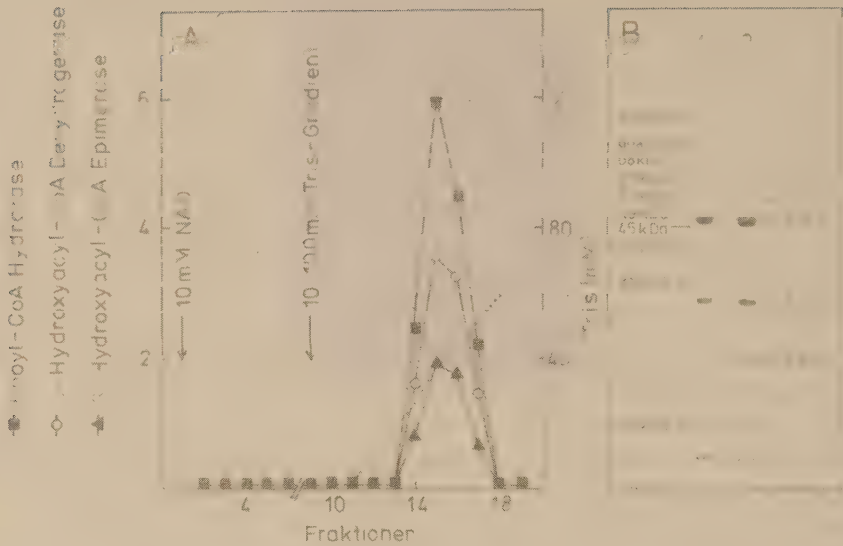


Abb. 42: Affinitätschromatographie von proteolytischen Fragmenten des TFE nach tryptischer Verdauung an NAD-Agarose (Type 1)

Gereinigtes TFE wurde limitierter Proteolyse mit 10 µg Trypsin/mg TFE unterzogen, wie in 2.15.1 beschrieben, und direkt anschließend auf eine NAD-Agarose-Säule gegeben.

A: Elutionsprofil der Enzymaktivitäten des proteolytischen TFE. Die Pfeile markieren das Anlegen der 10 mM NAD-Stoßelution bzw. eines 10-100 mM Tris-Gradienten.

B: 12% SDS-PAGE des Auftrags (Slot 1) und Fraktion 15 des Eluates (Slot 2) der NAD-Agarose.

Es wurde jeweils 8 µg Protein eingesetzt. Die Anfärbung erfolgte mit Coomassie Blue. Phosphorylase b (94 kDa), Transferrin (80 kDa), BSA (68 kDa), Pyruvatkinase (57 kDa), Glutamatdehydrogenase (53 kDa), Fumarase (49 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Aldolase (40 kDa), LDH (35 kDa) und Trypsininhibitor (20 kDa) dienten als Markerproteine.

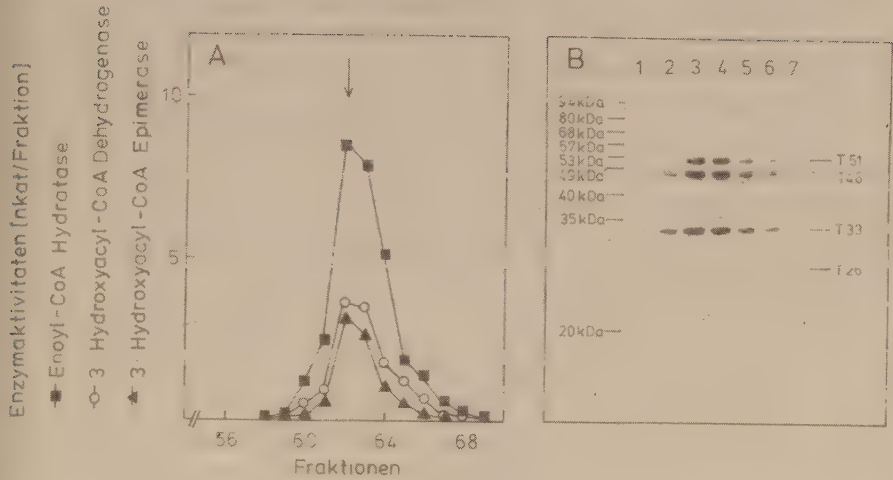


Abb. 43: Gelfiltration von proteolysiertem TFE nach tryptischer Verdauung an Sephacryl S-300

Nach limitierter Proteolyse des TFE mit 5 µg Trypsin/mg TFE (nach 2.15.1) wurde eine Gelfiltration durchgeführt.

A: Elutionsprofil der Enzymaktivitäten des proteolysierten TFE. Das Elutionsvolumen des ungespaltenen, tetrameren TFE wird durch einen Pfeil angezeigt.

B: 12% SDS-PAGE der Fraktionen des Elutionspeaks. Jeweils 1 ml der Fraktionen 60 bis 66 (entsprechend Slot 1-7) wurden für SDS-PAGE aufbereitet. Die Anfärbung erfolgte mit Coomassie Blue. Als Markerproteine wurden Phosphorylase b (94 kDa), Transferrin (80 kDa), BSA (68 kDa), Pyruvatkinase (57 kDa), Glutamatdehydrogenase (53 kDa), Fumarase (49 kDa), Aldolase (40 kDa), LDH (35 kDa) und Trypsininhibitor (20 kDa) verwendet.

3.6.3.5 Trennung der proteolytischen Fragmente des Trifunktionellen Enzyms zur aminoterminalen Sequenzanalyse

1 mg gereinigtes TFE wurde zur limitierten Proteolyse nach 2.15.1 mit 5 µg Trypsin versetzt. Zur Trennung der proteolytischen Fragmente wurde im Anschluß an die Proteolyse eine reverse-phase HPLC durchgeführt.

Abbildung 44 zeigt die Verteilung der durch SDS-PAGE (Abbildung 45) identifizierten proteolytischen Spaltprodukte in zwei unterschiedlichen, aufeinanderfolgenden Gradienten der HPLC. Während ein 8 kDa- und 33 kDa-Fragment bereits durch Anlegen des ersten Gradienten (0,1% Trifluoressigsäure in Wasser gegen 0,08% Trifluoressigsäure in 84% Acetonitril/16% Wasser) eluiert werden konnten, bedurfte es eines zweiten Gradienten (0,1% Trifluoressigsäure in 60% Ameisensäure/40% Wasser gegen 0,1% Trifluoressigsäure in 60% Ameisensäure/40% 2-Propanol), um die Bruchstücke T 51 und T 36, ein in nur geringer Konzentration durch limitierte Proteolyse gebildetes Peptid, zu eluieren. In dem T 51-Peak waren noch geringe Kontaminationen anderer Peptide, unter anderem auch des T 48-Fragments, nachweisbar. Ein Aliquot jeder Fraktion wurde zur Sequenzanalyse eingesetzt.

In einem weiteren Versuch wurde proteolysiertes TFE über SDS-PAGE präparativ aufgetrennt (wird nicht gezeigt). Hierzu wurden 800 µg von gereinigtem TFE verwendet, das nach 3-monatiger Aufbewahrung bei 4°C endogener Proteolyse unterlag (vgl. 3.6.3.1.3). Jeweils die 46 kDa-Bande wurde nach Anfärbung der Gelbanden mit Coomassie Blue zur Elektroelution mit anschließender Elektrodialyse eingesetzt (s. 2.13). Mit dieser Lösung wurde dann ebenfalls eine aminoterminal Sequenzanalyse durchgeführt.

Die nachfolgende Übersicht zeigt die Ergebnisse aus den aminoterminalen Sequenzanalysen:

Tabelle 10: Aminoterminal Sequenzanalysen mit proteolytischen Fragmenten des TFE

(1) 1 5 10 15 20 25 30 32
TILPEELVQAFKPDYVAPLVLALTS~~DKVPSK~~-

Aminosäure 1-32: 46 kDa-Fragment

Aminosäure 1-10: 33 kDa-Fragment

Aminosäure 1-23: 8 kDa-Fragment

(2) 1 5 10 1516
DSAAENEHLAAT~~KKFT~~-

Aminosäure 1-16: 36 kDa-Fragment

(3) keine Sequenz: TFE

51 kDa-Fragment

Die Aminosäuren sind vom N-Terminus des jeweiligen Peptids beginnend fortlaufend durchnummeriert. Zu jedem Fragment wird jeweils die Anzahl der nachweisbaren Aminosäuren der betreffenden Sequenz gegeben. Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code dargestellt.

Die N-terminalen Sequenzen des 46-, 33- und 8 kDa-Fragments waren in den ersten 10 Aminosäuren übereinstimmend, was anzeigt, daß es sich hierbei um homologe Fragmente handelt. Somit wird ebenfalls auf molekularer Ebene nahegelegt, daß die proteolytischen Fragmente aus Trypsinverdauung und endogener Proteolyse des TFE, soweit untersucht, homolog sind. Die weitreichendste Sequenzbestimmung von 32 Aminosäuren gelang beim 46 kDa-Fragment.

Eine hiervon unterschiedliche N-terminale Sequenz konnte für das 36 kDa-Fragment der tryptischen Verdauung des TFE bestimmt werden. Hier gelang der Nachweis bis zur sechszehnten Aminosäure.

Ebenso wie das nichtproteolysierte TFE (s. 3.6.2) lieferte das 51 kDa-Fragment keine nachweisbaren PTH-Aminosäuren nach mehreren Zyklen des Edman-Abbaus über den unspezifischen Hintergrund hinaus. Die Sequenz des 51 kDa-Fragments scheint ebenso wie das TFE N-terminal blockiert zu sein.

Die Ergebnisse der Sequenzanalyse geben im Vergleich mit der Erkennung von tryptischen Fragmenten des TFE in SDS-PAGE (Abb. 32), wo ein sequentielles Auftauchen von Peptidbanden gezeigt wird, einen Hinweis darauf, daß durch Trypsinbehandlung lediglich zwei primäre Spaltprodukte entstehen. Von diesen repräsentiert die 51 kDa-Bande offenbar den aminoterminalen Teil des TFE, während die 46 kDa-Bande die andere, carboxyterminale Hälfte der 93 kDa-Untereinheit des Trifunktionalen Enzyms darstellt.

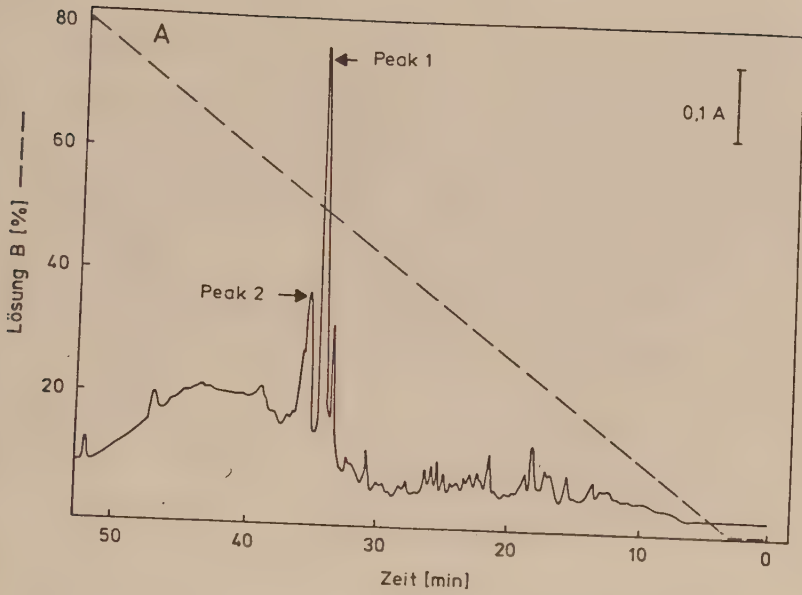


Abb. 44A

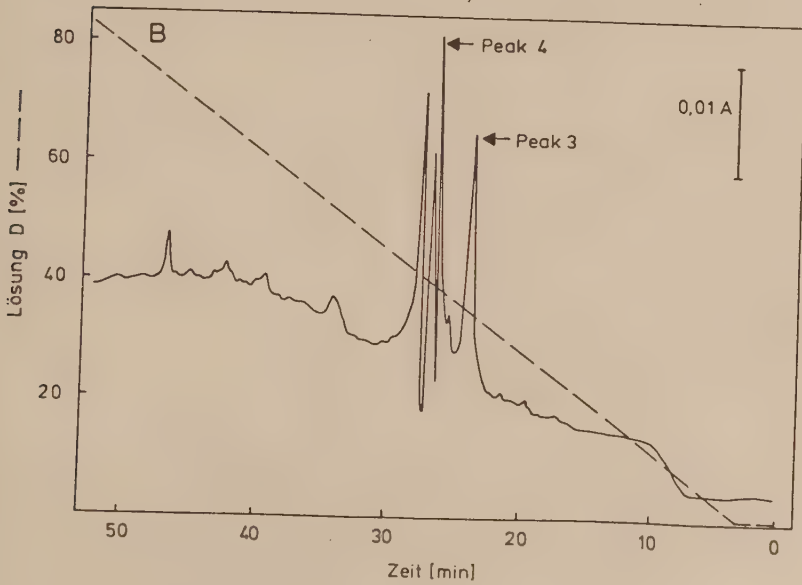


Abb. 44B

Abb. 44: Reverse-phase HPLC des Trifunktionellen Enzyms nach limitierter Proteolyse mit Trypsin

1 mg gereinigtes TFE wurde limitierter Proteolyse mit 5 μ g Trypsin nach 2.15.1 unterworfen und anschließend durch reverse-phase HPLC über Vydac C₁₈ 218 TP 514 (4,0 x 150 mm) aufgetrennt. Die Durchflußrate betrug 1 ml/min, die programmierten Gradientenbedingungen werden angezeigt. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 214 nm.

A: Nach Auftrag der Proteinprobe bei 0% Lösung B wurde ein Gradient folgender Mischungen angelegt:

Lösung A: 0,1% Trifluoressigsäure in Wasser

Lösung B: 0,08% Trifluoroessigsäure in 84% Acetonitril/16% Wasser

Anschließend wurde nach intensivem Spülen der Säule mit 0,1% Trifluoressigsäure in 60% Ameisensäure/40% Wasser ein zweiter Gradient angelegt:

B: Lösung C: 0,1% Trifluoressigsäure in 60% Ameisensäure/40% Wasser

Lösung D: 0,1% Trifluoressigsäure in 60% Ameisensäure/40% 2-Propanol

Die Peakfraktionen wurden isoliert aufgefangen und jeweils ein Aliquot der angezeigten Peaks 1-4 in SDS-PAGE überprüft (vgl. Abbildung 45), ein anderes Aliquot zur Sequenzanalyse eingesetzt.

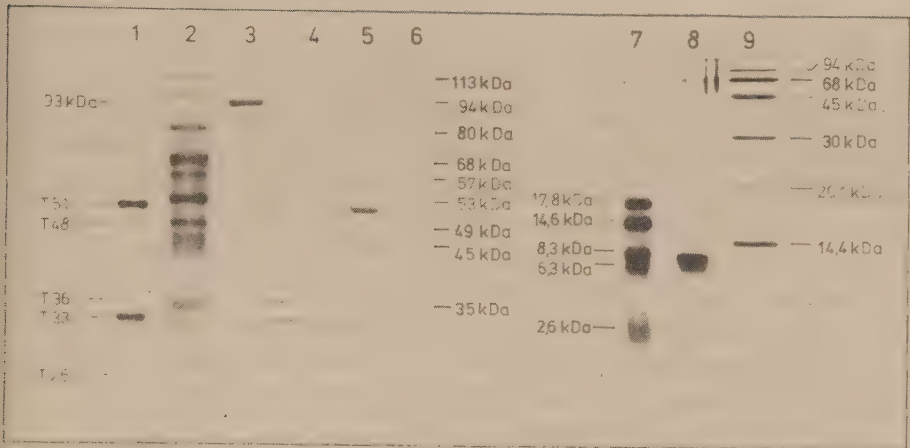


Abb. 45: SDS-PAGE der über HPLC-getrennten tryptischen Fragmente des Trifunktionellen Enzyms

Slot 1-6: 10% SDS-PAGE (2 mm)

Slot 1 : 10 µg trypsinbehandeltes TFE (nach 2.15.1, 5 µg Trypsin/mg TFE),

Slot 2 : Molekulargewichtsmarker (s.u.)

Slot 3 : 3 µg gereinigtes TFE

Slot 4 : Peak 2 des HPLC-Gradienten aus Abb. 44 A (Auftrag: 1/10 des Volumens)

Slot 5 : Peak 4 des HPLC-Gradienten aus Abb. 44 B (Auftrag: 1/10 des Volumens)

Slot 6 : Peak 3 des HPLC-Gradienten aus Abb. 44 B (Auftrag: 1/10 des Volumens)

Slot 7-9: 20% SDS-PAGE, 2 mm

Slot 7 : Bromcyan-gespaltenes Myoglobin nach Swank et al. (146), das relative Molekulargewicht der Spaltprodukte wird angezeigt

Slot 8 : Peak 1 des HPLC-Gradienten aus Abb. 44 A (Auftrag: 1/10 des Volumens)

Slot 9 : Molekulargewichtsmarker (s.u.)

Alle Banden wurden mit Coomassie Blue angefärbt. Als Molekulargewichtsmarker wurden β -Galaktosidase (113 kDa), Phosphorylase b (94 kDa), Transferrin (80 kDa), BSA (68 kDa), Pyruvatkinase (57 kDa), Glutamatdehydrogenase (53 kDa), Fumarase (49 kDa), Ovalbumin (45 kDa), LDH (35 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Trypsininhibitor (20,1 kDa) und α -Lactalbumin (14,4 kDa) verwendet.

3.7 Untersuchungen zur Biosynthese des Trifunktionellen Enzyms

3.7.1 Isolierung von mRNA aus Neurospora crassa

Neurospora crassa wurde für 24 h auf 1 l 2%igem (w/v) Saccharosemedium wachsen gelassen, geerntet, und durch Umsetzen der Hyphen weitere 12 h auf 1 l Medium mit 1 mM Ölsäure als einziger Kohlenstoffquelle induziert (103).

Es wurde mRNA einerseits aus Zellen gewonnen, die nach dem Wachstum auf dem Saccharosemedium geerntet wurden, andererseits solche mRNA, die aus ölsäureinduzierten Hyphen isoliert wurde. Die Aufarbeitung frisch geernteter Myzelien erbrachte gegenüber zur längeren Aufbewahrung tiefgefrorenen Hyphen eine größere Ausbeute an extrahierbarer RNA.

Die Isolierung der total-RNA erfolgte nach der Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode (120,121), wie unter 2.17.1 beschrieben. Hierzu wurde für jede Aufarbeitung 10 g Myzel eingesetzt. Die Anreicherung der poly A-RNA über Cäsiumchlorid-Gradientenzentrifugation (122) und Chromatographie an Oligo-dT-Cellulose (123) wird in 2.17.2 und 2.17.3 beschrieben.

Aus 10 g saccharosegewachsenen Myzel konnten 56 mg total-RNA, und nach Auftrennung über Oligo-dT-Cellulose 1 mg poly A-RNA gewonnen werden. Diese RNA-Fraktion hatte ein Absorptionsverhältnis von 1,92 bei 260/280 nm. 10 g ölsäureinduzierter Hyphen dagegen lieferte 135 mg total-RNA, die im Gegensatz zu der RNA aus saccharosegewachsenen Zellen zweimal chromatographisch über Oligo-dT-Cellulose gereinigt wurde, und schließlich 0,2 mg poly A-RNA mit einem Verhältnis $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}} = 1,96$ erbrachte.

Die isolierten RNA-Fractionen wurden unter sterilen Bedingungen bei -70°C aufbewahrt und erst unmittelbar vor Gebrauch zur in vitro Translation aufgetaut.

3.7.2 Identifizierung des in vitro Translationsproduktes des Trifunktionellen Enzyms

Die in vitro Translationen in Retikulozytenlysat-System wurden, wie unter 2.18 beschrieben, in 25 µl Ansätzen durchgeführt, denen jeweils 1 µg poly A-RNA zugesetzt wurde. Die jeweilige RNA-Präparation wurde unmittelbar vor dem Einsatz zur in vitro Translation aufgetaut und einer Hitzebehandlung (5 min bei 65°C) unterworfen (147). Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurden 5 µl des Translationsansatzes in SDS-Probenpuffer denaturiert und über SDS-PAGE aufgetrennt.

Zur Erkennung der mit L-(³⁵S)-Methionin markierten in vitro Translationsprodukte wurden Fluorographien durchgeführt.

Die Fluorogramme der Translatate von poly A-RNA aus saccharosegewachsenen und ölsäureinduzierten Myzellen aus N.crassa werden in Abbildung 46, Slot 1 und 2, im Vergleich nebeneinander gezeigt. Bei beiden RNA-Präparationen ließen sich nach in vitro Translation Proteinbanden bis in einen hohen Molekulargewichtsbereich (größer 100 kDa) nach mehrwöchiger Exponierung identifizieren, sie wiesen jedoch charakteristische Unterschiede im Bandenmuster auf. Aus diesen in vitro Translationsansätzen wurde versucht, durch indirekte Immunpräzipitation das synthetisierte Translationsprodukt des Trifunktionellen Enzyms zu isolieren. Hierzu wurden die Ansätze nach Methode 2.16.5 mit dem Antiserum gegen natives Trifunktionelles Enzym inkubiert, und die so erhaltenen Immunkomplexe mit Protein A-Sepharose CL-4B vom übrigen in vitro Translationsansatz abgetrennt. Eine wesentliche Voraussetzung zur eindeutigen Identifizierung des Translationsproduktes war die Vermeidung von unspezifischen Antigen-Antikörper-Bindungen sowie von unspezifischen Bindungen an Protein A-Sepharose. Hierzu wurde einerseits eine Vorinkubation mit Präimmunserum sowie andererseits die Anwendung von detergenshaltigen Puffern zum Waschen der Immunpellets gewählt (vgl. 2.16.5). Die Immunpräzipitate wurden durch SDS-PAGE mit nachfolgender Fluorographie analysiert (Abbildung 46, Slot 4-9).

Aus in vitro Translationsansätzen, die mit poly A-RNA aus ölsäureinduzierten Hyphen durchgeführt wurden, konnte mit dem Antiserum gegen natives TFE durch indirekte Immunpräzipitation eine Proteinbande bei 93 kDa erhalten werden (Abb. 46, Slot 8). Die Intensität dieser Bande im Fluorogramm konnte durch eine Verdrängungsreaktion in einem parallel aufgearbeiteten Ansatz mit 4 µg gereinigtem, nicht-markierten TFE, das vor der Immunpräzipitation zugegeben wurde, abgeschwächt werden (Abb. 46, Slot 5 und 9). Keine radioaktiv markierte Proteinbande konnte in solchen durchgeführten Immunpräzipitationen identifiziert werden, in denen anstatt des Antiserums Präimmunserum eingesetzt wurde (Abb. 46, Slot 7). Ebenfalls kein radioaktiv markiertes Immunpräzipitat wurde nach der Inkubation von Antiserum mit in vitro Translationsansätzen, die mit poly A-RNA aus saccharosegewachsenen Myzelien durchgeführt wurden, erhalten (Abb. 46, Slot 6).

Die aufgeführten Ergebnisse lassen die Schlußfolgerung zu, daß es sich bei der durch indirekte Immunpräzipitation aus in vitro Translationsansätzen identifizierten Bande um den Precursor des Trifunktionellen Enzyms handelt.

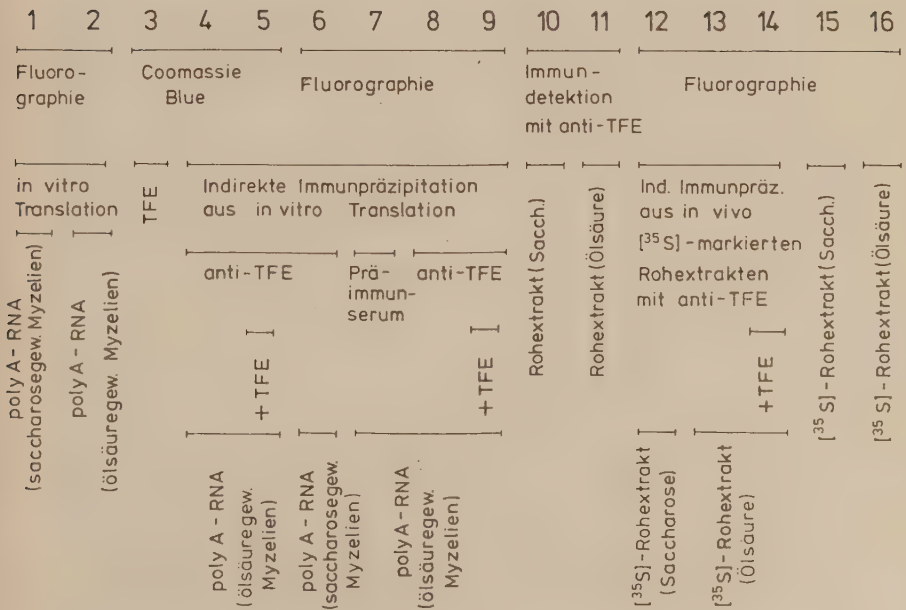
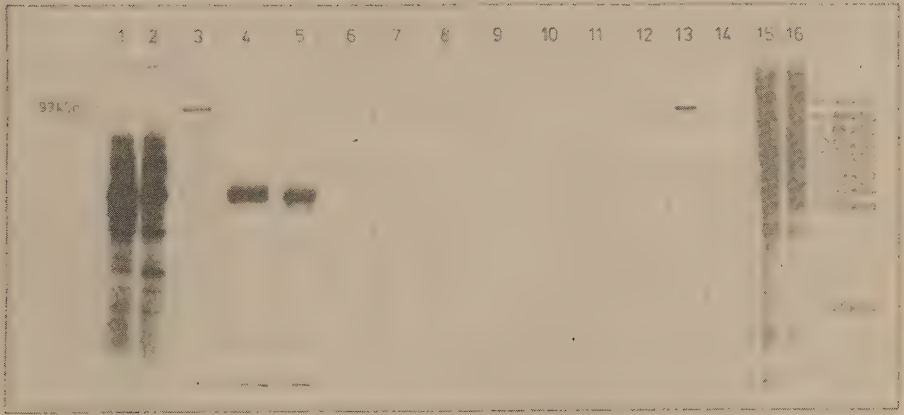


Abb. 46

Abb. 46: Gelelektrophoretischer Vergleich des Trifunktionellen Enzyms aus in vitro Translation und Rohextrakten durch 12% SDS-PAGE

- Slot 1,2,6,7,8,9,12,13,14,15,16:
Fluorographie nach L-(³⁵S)-Methionin-Markierung
Slot 3,4,5: Coomassie Blue-Anfärbung
Slot 10 und 11: Immunspezifische Anfärbung durch Antiserum gegen natives TFE (1:1000)
Slot 1 und 2: In vitro Translatate, je 10 µCi (7 Tage exponiert)
Slot 1: Poly A-RNA aus saccharosegewachsenen Myzelien
Slot 2: Poly A-RNA aus ölsäureinduzierten Myzelien
Slot 3: 3 µg gereinigtes TFE
Slot 4-9: Indirekte Immunpräzipitation aus in vitro Translation (zur Fluorographie 7 Tage exponiert)
Slot 4,5,8,9: Immunpräzipitation mit Antiserum gegen natives TFE (1:100) aus in vitro Translation mit poly A-RNA aus ölsäureinduzierten Myzelien
Slot 5 und 9: Immunpräzipitation mit Antiserum gegen natives TFE (1:100) in Gegenwart von 4 µg gereinigtem TFE
Slot 7: Immunpräzipitation mit Präimmunserum (1:100) aus in vitro Translation mit poly A-RNA aus ölsäureinduzierten Myzelien
Slot 6: Immunpräzipitation mit Antiserum gegen natives TFE (1:100) aus in vitro Translation mit poly A-RNA aus saccharosegewachsenen Myzelien
Slot 10: Immunoblotting eines Rohextraktes von saccharosegewachsenen Myzelien
Slot 11: Immunoblotting eines Rohextraktes von ölsäure-induzierter Myzelien
Slot 12-14: Indirekte Immunpräzipitation des TFE aus in vivo-L-(³⁵S)-Methionin-markierten Rohextrakten mit Antiserum gegen natives TFE (1:100)
Slot 12: Immunpräzipitation aus einem Rohextrakt saccharosegewachsener Myzelien
Slot 13: Immunpräzipitation aus einem Rohextrakt ölsäureinduzierter Myzelien
Slot 14: Immunpräzipitation aus einem Rohextrakt ölsäureinduzierter Myzelien in Gegenwart von 2,4 µg gereinigtem TFE
Slot 15-16: in vivo-L-(³⁵S)-Methionin-markierte Rohextrakte (15 µg)
Slot 15: Rohextrakt von saccharosegewachsenen Myzelien
Slot 16: Rohextrakt von ölsäureinduzierten Myzelien
Molekulargewichtsmarker: Phosphorylase b (94 kDa), Transferrin (80 kDa), BSA (68 kDa), Pyruvatkinase (57 kDa), Glutamatdehydrogenase (53 kDa), Fumarase (49 kDa), Ovalbumin (45 kDa), LDH (35 kDa), Trypsin-inhibitor (20 kDa).

3.7.3 Vergleich des Molekulargewichtes des in vitro Translationsproduktes des Trifunktionellen Enzyms mit der reifen Proteinuntereinheit

In Abbildung 46 wird ein Vergleich der Molekulargewichte des in vitro Translationsproduktes des TFE mit der Untereinheit des reifen TFE unter Anwendung unterschiedlicher Nachweismethoden gezeigt.

Bei allen hier aufgezeigten Methoden konnte ein Molekulargewicht von 93 kDa bestimmt werden (vgl. 3.3.1), wobei kein Unterschied in der gelelektrophoretischen Beweglichkeit zwischen reifer Untereinheit und dem in vitro Translationsprodukt beobachtet werden konnte.

Bei der vergleichenden Betrachtung wurde einerseits das zur Homogenität gereinigte Protein (Abb. 46, Slot 3), andererseits das immunologisch aus Rohextrakten nachgewiesene Protein herangezogen (Abb. 46, Slot 10-14).

Zur Bereitung von Rohextrakten fanden hierbei solche Zellen Verwendung, die auf einem 2%igen (w/v) Saccharosemedium 24 h lang gewachsen waren bzw. anschließend auf ein Medium, das 1 mM Ölsäure-1%(w/v) Tergitol NP 40 als einzige Kohlenstoffquelle enthielt, umgesetzt wurden. Im Falle der radioaktiv markierten Rohextrakte (Abb. 46, Slot 12-16) wurde bei der Anzucht der Hyphen den Kulturmedien (je 100 ml) jeweils 0,5 mCi L-(³⁵S)-Methionin hinzugegeben. Durch Zugabe von Proteaseinhibitoren zum Aufschlußmedium (vgl. 2.6.1, Puffer A mit 1,15 mM PMSF) wurde vor proteolytischem Abbau des TFE geschützt.

Jeweils aus den Rohextrakten, die aus ölsäureinduzierten Zellen gewonnen wurden, war durch immunspezifische Anfärbung (Abb. 46, Slot 11) bzw. durch indirekte Immunpräzipitation aus radioaktiv markiertem Rohextrakt (Abb. 46, Slot 13) mit dem spezifischen Antiserum die 93 kDa-Untereinheit des TFE mit der dem in vitro Translationsprodukt entsprechenden gelelektrophoretischen Beweglichkeit nachweisbar.

Die Anwendung der hier dargestellten Methoden machte allerdings den direkten Vergleich aller in Abbildung 46 gezeigten Banden auf einem Gel unmöglich. Die Vergleichbarkeit wird jedoch dadurch sichergestellt, daß jeweils proteingefärbtes,

gereinigtes TFE bei jeder der erwähnten Nachweismethoden als Molekulargewichtsmarker mitaufgetragen wurde.

Im Rahmen des Auflösungsvermögens von SDS-PAGE besitzt das im Kaninchen-Retikulocytenlysate-System synthetisierte in vitro Translationsprodukt offenbar die der reifen Proteinuntereinheit des TFE genau entsprechende Größe.

3.7.4 Nachweis des in vitro Translationsproduktes und der reifen Proteinuntereinheit des Trifunktionellen Enzyms in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle der Kulturmedien bei der Anzucht

Es wurde in 3.7.2 bereits betont, daß das in vitro Translationsprodukt des TFE lediglich in solchen Translationsansätzen nachweisbar war, die durch Zugabe von poly A-RNA aus ölsäureinduzierten Myzelien gesteuert wurden (Abb. 46, Slot 8). Mit poly A-RNA aus saccharosegewachsenen Zellen dagegen konnte ein Precursor des TFE nicht nachgewiesen werden (Abb. 46, Slot 6). Diesem Unterschied entsprechend scheint sich auch die Zusammensetzung der mRNA solcher Zellen wesentlich zu unterscheiden, wie aus den verschiedenen Proteinmustern der jeweiligen Translatate ersichtlich ist (Abb. 46, Slot 1 und 2). Die Regulation der Enzyminduktion setzt offenbar demnach schon auf der Ebene der Transkription ein.

Außerdem konnte in Rohextrakten von saccharosegewachsenen Hyphen weder durch Immunoblotting (Abb. 46, Slot 10) noch durch indirekte Immunpräzipitation (Abb. 46, Slot 12) Trifunktionelles Enzym nachgewiesen werden. Ein Nachweis gelang auch hier erst in Rohextrakten von ölsäureinduzierten Zellen (Abb. 46, Slot 11 und 13), so daß eine de novo Synthese des Trifunktionellen Enzyms nahegelegt wird.

4. DISKUSSION

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zielten darauf ab, das nicht-mitochondriale, aber auch nicht-peroxisomale β -Oxidationssystem in Neurospora crassa molekular anhand der Enzyme der 2. und 3. Reaktion des Fettsäureabbaus (2-Enoyl-CoA Hydratase und L-3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase) zu charakterisieren und mit den bekannten mitochondrialen und peroxisomalen Systemen zu vergleichen. In den bisher molekular untersuchten peroxisomalen β -Oxidationssystemen sind diese Enzymaktivitäten zu einem multifunktionellen Protein zusammengefaßt, während die Reaktionen in Mitochondrien von individuellen monofunktionellen Proteinen katalysiert werden.

Die bisherigen Untersuchungen der in Microbodies lokalisierten β -Oxidationssysteme beschränkten sich zum Zeitpunkt der Aufnahme dieser Arbeit auf je ein tierisches (Rattenleber), ein pflanzliches (Gurkensamen) und ein mikrobielles (Candida tropicalis) System. Das in dieser Arbeit beschriebene β -Oxidationssystem in N.crassa stellt somit das vierte molekular untersuchte β -Oxidationssystem dar.

1982 zeigten Hii und Courtright (148), daß der filamentöse Pilz Neurospora crassa auf Medien mit langkettigen Fettsäuren als einziger Kohlenstoffquelle wachsen kann. Die Induktion der β -Oxidationsaktivitäten in acetat- und ölsäuregewachsenen Hyphen wurde von den Autoren untersucht. Vermutlich führten jedoch u.a. die Verwendung von Substraten mit verschiedenen Kettenlängen im Enzymtest und die unzureichende Auftrennung der Organellenfraktionen zur Messung unterschiedlicher Induktionswerte der einzelnen Enzymaktivitäten.

Kionka und Kunau dagegen zeigten durch Untersuchungen der induzierbaren β -Oxidation in N.crassa in Verbindung mit der Bestimmung der partikulären Verteilung der Enzymaktivitäten nach Saccharosedichtegradientenzentrifugation, daß die Aktivitäten aller β -Oxidationsenzyme nach 12-stündigem Wachstum auf ölsäure als einziger Kohlenstoffquelle in relativ gleichem Ausmaß 15-22fach im Vergleich zu saccharosegewachsenen Hyphen induziert wurden (103). Eine Ausnahme hierbei bildete nur die 2-

Enoyl-CoA Hydratase. Dies ließ sich auf die duale Verteilung der Hydrataseaktivität nach isopyknischer Zentrifugation eines Rohhomogenats im Saccharosegradienten zurückführen. Ein Aktivitätspeak fiel mit den durch das mitochondriale Leitenzym Fumarase gekennzeichneten Fraktionen ($1,19 \text{ g/cm}^3$), der andere mit den übrigen β -Oxidationsenzymen und den Leitenzymen des Glyoxylatzyklus ($1,21 \text{ g/cm}^3$) zusammen. Die mitochondriale Hydrataseaktivität erwies sich als konstitutiver Bestandteil auch von saccharosegewachsenen Zellen.

Vergleiche mit Arbeiten von Theimer et al. (104,105) an der "slime"-Mutante von N.crassa legten nahe, daß es sich bei diesen, die Enzyme des Fettsäureabbaus enthaltenden Partikeln um Microbodies (Glyoxysomen) handelte. Bereits bei der Bestimmung der Aktivitäten der einzelnen β -Oxidationsenzyme unterschied sich das in N.crassa bestimmte β -Oxidationssystem in einem Punkt entscheidend von allen anderen bisher in Microbodies untersuchten Systemen dadurch, daß die erste Reaktion des Fettsäureabbaus durch β -Oxidation nicht von einer Acyl-CoA Oxidase, sondern von einer Acyl-CoA Dehydrogenase katalysiert wird.

Katalase wurde im Saccharosedichtegradienten deutlich von den Glyoxysomen abgetrennt und bei einer Dichte von $1,26 \text{ g/cm}^3$ in einer anderen partikulären Fraktion bestimmt. Die gleichzeitige Abwesenheit von Katalase- und Oxidaseaktivität in diesen Glyoxysomen, die damit sichtlich keine peroxisomalen Funktionen tragen, charakterisierte diese Organellen als einen besonderen Typ von Glyoxysomen und ihr β -Oxidationssystem als einen neuen Typ der nicht-mitochondrialen β -Oxidation.

Die molekulare Charakterisierung dieses β -Oxidationssystems erforderte als ersten Schritt die Isolierung von dessen Proteinen, und diese wiederum geeignetes Zellmaterial. Für die Reinigung der in dieser Arbeit beschriebenen Proteine wurden Zellen (Hyphen) verwendet, die durch Anzuchtbedingungen gewonnen wurden, die sich einerseits durch eine hohe Zellausbeute, andererseits aber auch durch eine möglichst große Induktion der β -Oxidationsaktivitäten auszeichneten. Da N.crassa nur ein relativ schlechtes Wachstum auf Medien, die Ölsäure als einzige Kohlenstoffquelle enthielten, zeigte (103,134), wurde

ein Umsetzverfahren angewendet, bei welchem die Hyphen nach Wachstum auf einer Vorkultur mit Acetat schließlich in Kulturmedien mit Acetat und Ölsäure gemeinsam als Kohlenstoffquellen angezogen wurden (3.1). Nach 24 h konnte so aus 11 l Medium mehr als 60 g Myzel gewonnen werden, welches relativ hohe Aktivitäten der einzelnen β -Oxidationsenzyme aufwies (Tab. 1).

Die Anwendung verschiedener säulenchromatographischer Techniken ermöglichte die Isolierung von drei Proteinen aus N.crassa, die Enzymaktivitäten des Abbaus gesättigter und ungesättigter Fettsäuren besaßen: Ein Trifunktionelles Enzyme (TFE) mit 2-Enoyl-CoA Hydratase-, L-3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase- und 3-Hydroxyacyl-CoA Epimeraseaktivität, eine zweite 2-Enoyl-CoA Hydratase und eine 3-cis,2-trans-Enoyl-CoA Isomerase.

Durch drei Schritte, welche die Kationenaustauschchromatographie an Phosphocellulose, eine "dye-ligand"-Chromatographie an Blue Sepharose CL-6B und eine Adsorptionschromatographie an Hydroxylapatit umfaßten, konnte ein β -Oxidationsprotein zur Homogenität gereinigt werden, dessen Untereinheiten ein Molekulargewicht von 93 kDa aufwiesen (3.2.2). Das Molekulargewicht des nativen Proteins wurde durch Gelfiltration bestimmt und zeigte, daß es nach der Reinigung wahrscheinlich als tetrameres Protein vorlag. Drei Enzymaktivitäten sind in diesem Protein enthalten: 2-Enoyl-CoA Hydratase, L-3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase und 3-Hydroxyacyl-CoA Epimerase. Die Multifunktionalität dieses Trifunktionellen Enzyms ergibt sich aus sehr unterschiedlichen Ergebnissen: Einerseits wurde unter denaturierenden Bedingungen nur eine Proteinbande nach gelelektrophoretischer Auftrennung durch SDS-PAGE (Abb. 4) bzw. im NEPHGE-System (Abb. 19) und lediglich ein Peak nach reverse-phase HPLC (Abb. 31) erhalten, andererseits blieb das Verhältnis der Enzymaktivitäten während der angewandten Reinigungsschritte konstant (Tab. 2). Die Messung abweichender Aktivitätsverhältnisse in Bezug auf die 2-Enoyl-CoA Hydratase im Rohextrakt vor dem ersten Reinigungsschritt (Phosphocellulose) begründet sich in der Verteilung der Hydrataseaktivität auf zwei molekular verschiedene Proteine, die sich durch Kationen-

austauschchromatographie voneinander trennen ließen (Abb. 1). Weitere Versuche mit dem gereinigten Protein, darunter Affinitätschromatographie an NAD-Agarose (Abb. 5) sowie Gelfiltration an Sephacryl S-300 (Abb. 13B), ergaben ebenfalls identische Elutionsprofile der drei Enzymaktivitäten.

Nach den gelelektrophoretischen Analysen handelte es sich um vier Untereinheiten des TFE mit identischem Molekulargewicht und isoelektrischem Punkt. Dies wies darauf hin, daß das TFE als ein Homotetramer mit identischen Untereinheiten vorlag (auf eine Diskussion weiterer Untersuchungen hierzu (s.S. 170) sei an dieser Stelle hingewiesen.

Multifunktionelle Proteine konnten schon zuvor aus den drei molekular untersuchten peroxisomalen β -Oxidationssystemen (Rattenleber, Gurkensamen und C.tropicalis) gereinigt und charakterisiert werden. Sie weisen große Ähnlichkeit in ihrer katalytischen Funktion mit dem Trifunktionellen Protein aus N.crassa, jedoch molekulare Unterschiede insbesondere in ihrer Quartärstruktur auf (vgl. Tabelle 11). Osumi und Hashimoto reinigten 1979 erstmals ein bifunktionelles Protein aus der Leber von DEHP-behandelten Ratten, das 2-Enoyl-CoA Hydratase und L-3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase auf einer einzigen Polypeptidkette enthielten (90,94). Schon wenig später gelang die Isolierung eines ebenfalls bifunktionellen Enzyms aus Glyoxysomen der Keimblätter der Chinesischen Schlangengurke von Frevert und Kindl (95). Beide Enzyme sind monomere Proteine, die sowohl in ihren molekularen als auch in ihren katalytischen Eigenschaften große Ähnlichkeiten zueinander zeigen.

Innerhalb der Gruppe der eukaryotischen Mikroorganismen gelang der Nachweis eines multifunktionellen Proteins erstmals in Candida tropicalis (96). Dieses unterschied sich aber durch seine Struktur sowie durch eine zusätzliche katalytische Funktion von den erwähnten bifunktionellen Proteinen aus Ratte und Gurke: Ein größeres Molekulargewicht der Untereinheit, sein Vorliegen als Dimer und der offenbar nicht-basische Charakter dieses Proteins (gemessen am Bindungsverhalten der Proteine in der Ionenaustauschchromatographie bzw. an den Fällen, in welchen eine Bestimmung des isoelektrischen Punktes vorge-

nommen wurde) grenzen das Enzym molekular von den anderen ab. Zusätzlich trägt es ebenfalls, wie das TFE aus N.crassa 3-Hydroxyacyl-CoA Epimeraseaktivität.

Trifunktionelle Enzyme konnten vor kurzer Zeit außerdem sowohl in ölsäureinduzierten Zellen von C.lipolytica als auch in Aspergillus tamarii nachgewiesen werden (22,149). Erste Untersuchungen deuten darauf hin, daß die molekularen Eigenschaften dieser gleichfalls trifunktionellen Proteine dem TFE aus N.crassa sehr nahestehen.

Die zuvor erwähnten Untersuchungen legten nahe, daß das β -Oxidationssystem in Microbodies eukaryotischer Microorganismen offenbar mit einem trifunktionellen Enzym ausgestattet ist, wohingegen die peroxisomalen β -Oxidationssysteme höherer Pflanzen und Tiere bifunktionelle Enzyme besitzen.

Diese vermutete Regel besitzt jedoch offenbar keine Allgemeingültigkeit: Inzwischen legen Untersuchungen des multifunktionellen Enzyms aus Gurkenkotyledonen nahe, daß auch hier die 3-Hydroxyacyl-CoA Epimeraseaktivität integraler Bestandteil des Proteins ist und sich auf einer Polypeptidkette zusammen mit den schon zuvor bestimmten Enzymaktivitäten befindet (150). In diesen Versuchen konnte gezeigt werden, daß die gleichfalls in den Glyoxysomen gemessene Epimerase durch Zugabe von Antiserum gegen das 75 kDa-Protein immunpräzipitiert wurde. Ebenso kann bisher auch für das multifunktionelle Enzym aus Rattenleber nicht eindeutig ausgeschlossen werden, ob dieses nicht vielleicht zusätzliche Enzymaktivitäten trägt. In den ursprünglichen Veröffentlichungen wird die Messung der Epimerase nicht erwähnt. Ein knapper Hinweis hierzu findet sich lediglich in einer Veröffentlichung von Yang und Schulz, die weder 3-cis, 2-trans-Enoyl-CoA Isomerase- noch Epimeraseaktivität in einer Probe des gereinigten bifunktionellen Proteins nachweisen konnten (20).

Tabelle 11: Multifunktionelle Proteine aus nicht-mitochondrialen β -Oxidationssystemen

Organismus	Enzymaktivitäten	Unterein- heit	Molekulargewicht nativ	pI	Bindung an Ionenau- tauscher ²	Literatur
Rattenleber	<HD>	78.000	78.000	9,5-9,9	Phospho- cellulose, CM-Cellulose	(94)
Gurkensamen	<HD>, evtl. <HDE>	75.000	75.000	9,8	CM-Cellulose	(95,150)
Candida tropicalis	<HDE>	102.000	188.000	?	DEAE-Cellulose	(96)
Candida lipolytica	<HDE>	92.000	?	?	Phospho- cellulose	(151)
Aspergillus tamarif	<HDE>	93.000	?	?	Phospho- cellulose	(149)
Neurospora crassa	<HDE>	93.000	365.000	$\geq 9,0$	Phospho- cellulose	

¹H: 2-Enoyl-CoA Hydratase
D: L-3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase
E: 3-Hydroxyacyl-CoA Epimerase
²bei neutralem pH (7,0-7,4)

Während zwischen den multifunktionellen Proteinen der in Microbodies lokalisierten β -Oxidationsenzyme molekulare Ähnlichkeiten bestehen, unterscheiden sich diese molekular von den individuellen monofunktionellen β -Oxidationsenzymen der mitochondrialen β -Oxidation.

Erstaunliche Ähnlichkeiten aber besitzt die molekulare Organisation der β -Oxidation in Microbodies und in Escherichia coli. In E.coli bilden verschiedene Enzyme der β -Oxidation ein Operon (15,20,21). Es konnte gezeigt werden, daß diese Enzyme zu eine Multienzymkomplex zusammengefaßt sind (17-19). Verschiedene Autoren haben die molekularen Analogien der multifunktionellen Proteine der Microbodies zur Struktur der 78 kDa α -Untereinheit des Multienzymkomplexes aus E.coli diskutiert (22,95,96,152). Dieser Eindruck wird durch die Untersuchungen der molekularen Organisation der β -Oxidation in N.crassa gestärkt. Trotz der erwähnten Analogien zum β -Oxidationskomplex in E.coli unterscheidet das TFE aus N.crassa, wie auch andere multifunktionelle Proteine aus nicht-mitochondrialer β -Oxidation in Microbodies (soweit untersucht) insbesondere durch die Abwesenheit von 3-Oxoacyl-CoA Thiolase und 3-cis,2-trans-Enoyl-CoA Isomerase. Auf der Polypeptidkette der α -Untereinheit des Multienzymkomplexes aus E.coli befindet sich im Vergleich zu den Aktivitäten des Trifunktionellen Enzyms aus N.crassa zusätzlich noch die 3-cis,2-trans-Isomeraseaktivität, während die 42 kDa β -Untereinheit die 3-Oxoacyl-CoA Thiolaseaktivität trägt (19,20).

Es erschien daher im Zuge dieser Arbeit besonders erforderlich, den Verlauf der Isomeraseaktivität während der Reinigungsschritte des TFE zu verfolgen. Die Abtrennung der 3-cis,2-trans-Enoyl-CoA Isomerase vom TFE gelang erst im zweiten Reinigungsschritt durch "dye-ligand"-Chromatographie an Blue Sepharose CL-6B. Durch eine anschließende Adsorptionschromatographie an Hydroxylapatit konnte die Isomerase 155-fach angereichert werden (Tab. 2).

Die 3-Oxoacyl-CoA Thiolase wurde durch Kationenaustauschchromatographie an Phosphocellulose vom TFE in N.crassa abgetrennt und durch Anwendung weiterer säulenchromatographischer

Methoden zur Homogenität gereinigt (134).

In der Kationenaustauschchromatographie an Phosphocellulose wurde eine zweite 2-Enoyl-CoA Hydrataseaktivität gefunden, die sich deutlich von den übrigen β -Oxidationsaktivitäten abtrennen ließ (3.2.1). Diese Enzymaktivität wurde mit einem Protein mit einem Molekulargewicht von 182.000 zur Homogenität gereinigt. Nach SDS-PAGE war nur eine Proteinbande bei 31 kDa nachweisbar (Abb. 11); diese zweite Enoyl-CoA Hydratase besteht demnach aus 6 Untereinheiten mit identischem Molekulargewicht. Diese molekularen Eigenschaften des Enzyms zeigen auffallende Ähnlichkeiten mit den bisher aus verschiedenen Säugetiergeweben gereinigten Enoyl-CoA Hydratase (Crotonasen) der mitochondrialen β -Oxidation. Aus Rinderleber (89), Rattenleber (90) und Schweineherzmuskel (91) konnten ebenfalls hexamere Proteine mit etwas geringeren Molekulargewichten von 155-164 kDa gereinigt werden. Alle Enzyme binden wie die 2-Enoyl-CoA Hydratase aus N.crassa ebenfalls an Phosphocellulose.

Das Vorhandensein von zwei molekular unterschiedlichen 2-Enoyl-CoA Hydratase in N.crassa warf die Frage nach ihrer Beteiligung an der β -Oxidation der Fettsäuren auf. Daher wurde deren intrazelluläre Lokalisation bestimmt. Die Existenz einer zweiten konstitutiven Hydratase wurde, wie schon erwähnt, aus der dualen Verteilung dieser Enzymaktivität auf die mitochondrialen und glyoxysomalen Fraktionen nach Saccharosedichtegradientenzentrifugation eines Rohhomogenates abgeleitet (103). Durch Immunoblotting von Fraktionen eines 30-60%igen Saccharosegradienten mit dem spezifischen Antiserum gegen die 2-Enoyl-CoA Hydratase konnte gezeigt werden, daß innerhalb der partikulären Fraktionen dieses Protein nur in den durch die Fumarase als mitochondriales Leitenzym gekennzeichneten Fraktionen nachweisbar war (Abb. 29). Der zweite Hydratasepeak, der im Gradienten bei einer Dichte von 1,21 g/cm³ gemessen wurde und somit die katalasefreien Fraktionen der Glyoxysomen umfaßte, konnte auf die Enzymaktivität des Trifunktionellen Enzyms zurückgeführt werden (Abb. 28). Die Bestimmung der intrazellulären Lokalisation des TFE gelang durch Immunoblotting der partikulären Fraktionen des Saccha-

rosedichtegradienten (Abb. 29) sowie durch immunocytochemische Anfärbung von Ultradünnschnitten der Hyphen durch Protein-A-Gold-Markierung (Abb. 30). Das partikuläre Vorkommen des TFE ist demnach exklusiv auf die Lokalisation in Microbodies beschränkt. Ein relativ großer Anteil (vermutlich $\geq 50\%$) des TFE war in der peripheren Matrix der Microbodies nachweisbar (3.5.2 und 3.5.3). Unter den gewählten Versuchsbedingungen konnten in ölsäureinduzierten Hyphen in Serienschnitten in allen Microbodies Goldpartikel gefunden werden (Veenhuis, Universität Groningen, Niederlande, persönliche Mitteilung), so daß der Nachweis von zwei unterschiedlichen Microbody-Populationen in diesen Zellen nicht erbracht werden konnte. Es gibt somit zwei molekular verschiedene 2-Enoyl-CoA Hydratase in N.crassa: Eine ist in Mitochondrien, die andere, als Bestandteil eines multifunktionellen β -Oxidationsproteins, in Microbodies lokalisiert.

Da offensichtlich alle Enzymaktivitäten zur vollständigen β -Oxidation der Fettsäuren sich in den Glyoxysomen befinden (103), stellt sich die Frage nach der physiologischen Bedeutung der zweiten 2-Enoyl-CoA Hydratase in den Mitochondrien. Fong und Schulz wiesen in Mitochondrien des Schweineherzmuskels neben der Crotonase, die bevorzugt kurzkettige Fettsäuren umsetzt, eine zweite "long-chain" 2-Enoyl-CoA Hydratase nach und machten die Existenz multipler Formen der Hydratase auch für andere Säugetiergewebe wahrscheinlich (91). Die spezifische Aktivität der Crotonase war in der Schweineleber und -niere besonders hoch, und diese gewebespezifische Abhängigkeit diskutierten die Autoren in Beziehung zur zentralen Funktion dieser Organe im Aminosäurestoffwechsel, welche die Anwesenheit von Crotonase zur Hydratisierung der Metabolite von Valin, Leucin und Isoleucin erfordert (153). In Analogie zur strukturellen Verwandtschaft mit den aus Säugetiergeweben gereinigten Crotonasen und der intrazellulären Lokalisation wäre auch eine mögliche Beteiligung der mitochondrialen Enoyl-CoA Hydratase in N.crassa am Aminosäurestoffwechsel, losgelöst von Funktionen in der β -Oxidation der Fettsäuren, denkbar.

Eine ähnliche Verteilung der Enoyl-CoA Hydrataseaktivität auf Mitochondrien und Microbodies liegt vermutlich auch in Aspergillus tamarii vor (154). In diesem filamentösen Pilz konnte in Übereinstimmung mit N.crassa neben den Microbodies, in welchem die Leitenzyme des Glyoxylatzyklus bestimmt wurden, eine weitere partikuläre Fraktion in der Saccharosedichtegradientenzentrifugation eines Rohhomogenates bei einer Dichte von $1,26 \text{ g/cm}^3$ abgetrennt werden, in der ein Hauptanteil der Katalaseaktivität nachgewiesen wurde (34). In der Alge Eremosphaera viridis konnte ebenfalls eine Verteilung der Hydrataseaktivität auf Mitochondrien und Peroxisomen gezeigt werden, obwohl in diesem Fall das Vorkommen einer mitochondrialen β -Oxidation neben der in den Microbodies lokalisierten diskutiert wird (57).

Aufgrund des Vorkommens von 2-Enoyl-CoA Hydratase als Bestandteil verschiedener Stoffwechselwege an unterschiedlichen intrazellulären Orten ist die Messung allein der Hydrataseaktivität als Leitenzym für das Vorhandensein eines vollständigen β -Oxidationssystems völlig unzureichend. Sehr wahrscheinlich durch die leichte Zugänglichkeit der kurzkettigen Substrate ist dies aber eine häufig geübte Praxis.

Durch die Messung von 3-cis,2-trans-Enoyl-CoA Isomerase konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, daß die Glyoxysomen in N.crassa die vollständige Enzymausstattung nicht nur zum Abbau der gesättigten, sondern auch der ungesättigten Fettsäuren besitzen. Das hierzu neben der Isomerase benötigte zweite zusätzliche Enzym, die NADPH-abhängige 2,4-Dienoyl-CoA Reduktase, war ebenfalls in den glyoxysomalen Fraktionen nachgewiesen worden (155).

Die metabolische Funktion der 3-Hydroxyacyl-CoA Epimerase ist bisher noch nicht geklärt. Die Frage nach der physiologischen Bedeutung scheint insofern besonders interessant, da die Epimerase im β -Oxidationssystem der Microbodies in einigen zuvor beschriebenen Fällen zusammen mit Aktivitäten des Fettsäureabbaus in einem multifunktionellen Enzym, in E.coli als Bestandteil eines Multienzymkomplexes bestimmt wurde.

Die Epimerase ist offenbar nicht in Mitochondrien anzutreffen (156), so daß dort Fettsäuren mit cis-Doppelbindungen an geradzahligen Kohlenstoffatomen nur über den 2,4-Dienoyl-CoA Reduktaseweg abgebaut werden können (12,75,106). Yang et al. (157) legten aufgrund kinetischer Untersuchungen nahe, daß auch in Rattenleberperoxisomen und E.coli ungesättigte Fettsäuren hauptsächlich über diesen Stoffwechselweg abgebaut werden. Sie fanden aber, daß ein kleiner, jedoch signifikanter Anteil (etwa 2%) der 2-trans,4-cis-Dienoyl-CoA-Metabolite direkt über die 2-Enoyl-CoA Hydratase oxidiert wird, wobei die hierbei anfallenden D-3-Hydroxyacyl-CoA-Ester zur Vermeidung von Akkumulationen durch die Epimerase zur weiteren β -Oxidation in die L-Isomere überführt werden. Die Effektivität dieser Reaktion wird durch ein "channeling" der Metabolite direkt auf das aktive Zentrum der Epimerase gewährleistet (158).

Die beiden unterschiedlichen Abbauewege ungesättigter Fettsäuren und ihre mögliche Beziehung zueinander sind in Abbildung 47 am Beispiel des Abbaus der Linolsäure dargestellt (s.S.162).

Ein besonderer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit wurde neben der Reinigung auf die strukturelle Charakterisierung des Tri-funktionellen Enzyms gelegt. Ziel dieser Untersuchungen war das Auffinden einer Domänenstruktur des TFE und die Zuordnung seiner Enzymaktivitäten auf diese strukturellen Domänen des Proteins.

Multifunktionelle Proteine sind Biokatalysatoren von struktureller und funktioneller Komplexität (159,160). Nichtkovalent assoziierte Untereinheiten können einen Multienzymkomplex bilden (wie der β -Oxidationskomplex in E.coli (19,20)), in dem autonome Funktionen von separaten Polypeptidketten ausgeführt werden. Wenn aber diese heterogenen Untereinheiten dagegen kovalent verbunden sind, kann daraus ein multifunktionelles Enzym entstehen. In diesem Fall sind die autonomen Funktionen auf die Domänen der Polypeptidkette verteilt. Die molekulare Verankerung solcher Funktionen bringt verschiedene Vorteile:

- ① Acyl-CoA Dehydrogenase
- ② Enoyl-CoA Hydratase
- ③ 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase
- ④ 3-Oxoacyl-CoA Thiolase
- ⑤ 2t,4c-Dienoyl-CoA Reduktase
- ⑥ 3c,2t-Enoyl-CoA Isomerase
- ⑦ 3-Hydroxyacyl-CoA Epimerase

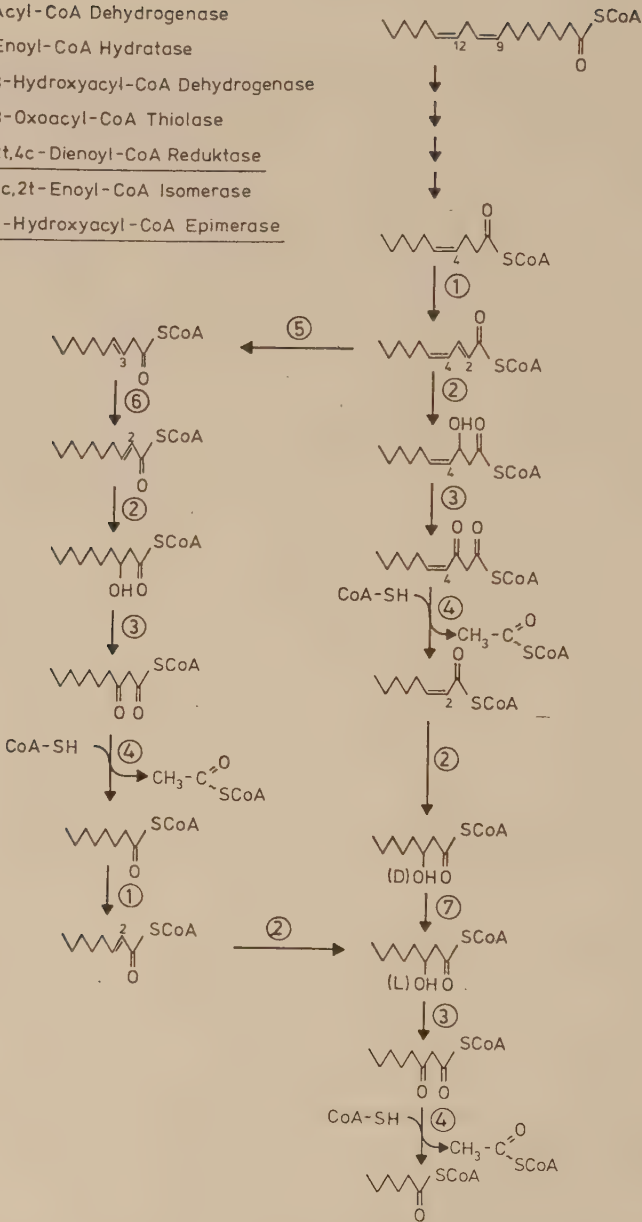


Abb. 47: Vereinfachte Darstellung der alternativen Abbauewege für Linolsäure nach Kunau (10-13) bzw. Stoffel (5,8) und ihre mögliche Verknüpfung in *N. crassa* (in Anlehnung an (157)).
 ②, ③ und ⑦ befinden sich auf einem trifunktionellen Enzym.

Einerseits begünstigt die unmittelbare Nähe der katalytischen Zentren vermutlich den Ablauf des gesamten metabolischen Prozesses. Die partikuläre Topologie der katalytischen Domänen kann sowohl den Reaktionsmechanismus sowie die Reaktionskinetiken beeinflussen. Ein solcher "channeling"-Mechanismus, bei welchem die Intermediate durch direkten Transfer von einem katalytischen Zentrum ohne Rückführung in das umgebende Medium auf das nächste übertragen werden, wurde kürzlich für verschiedene Substrate des bifunktionellen Enzyms aus Rattenleber sowie des β -Oxidationskomplexes in E.coli wahrscheinlich gemacht (157,158). Andererseits wird möglicherweise durch das Vorliegen multifunktionaler Proteine auch die Proteinbiosynthese ökonomischer, weil die kovalente Bindung von Domänen die Assoziation der Enzyme unabhängig von der Proteinkonzentration macht.

Domänen sind autonome, globuläre Regionen von Proteinen von definierter Größe und Zusammensetzung. Sie besitzen eine stabile Tertiär- und Quartärstruktur und erfüllen voneinander losgelöste Funktionen (159). Domänen, die im allgemeinen eine relativ große Resistenz gegenüber der Wirkung von Proteasen aufweisen, werden über Bereiche der Polypeptidkette ("hingeregion") miteinander verknüpft, die häufig proteasesensitiv sind. Aus diesem Grunde wurde häufig die limitierte Proteolyse als Methode zur Untersuchung der strukturellen Eigenschaften multifunktionaler Proteine verwendet, die zu Modellvorstellungen über die Anordnung verschiedener Funktionen auf einer Polypeptidkette führten, und verdeutlichen, daß viele multifunktionelle Proteine aus Domänen bestehen, von denen jede eine bestimmte Funktion trägt (161-164).

Auch in dieser Arbeit konnte durch limitierte Proteolyse mit verschiedenen Proteasen eine Aufspaltung des TFE in dominante Fragmente erreicht werden. Die Molekulargewichte dieser Fragmente waren nach SDS-PAGE gleich oder zumindest sehr ähnlich (Abb. 36). Die Polypeptidkette besitzt an ihrer Spaltstelle vermutlich eine exponierte Konformation, die sie gegenüber proteolytischem Angriff an diesem Abschnitt besonders

empfindlich macht. Hinweise auf das Vorliegen einer Domänenstruktur im TFE lagen somit vor.

Die unter den gewählten Versuchsbedingungen effektivste aller Proteasen war das Trypsin. Aufgrund dieses methodischen Vorteils wurden weitere Proteolysen in Gegenwart von Trypsin durchgeführt.

Ein Vergleich der Kinetiken der Inaktivierung des TFE durch Proteolyse (Abb. 33) mit dem spezifischen Bandenmuster nach gelelektrophoretischer Auftrennung (Abb. 32) zeigte einerseits, daß alle drei Enzymaktivitäten, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, auch noch unter solchen Proteolysebedingungen meßbar waren, bei welchen die native 93 kDa Untereinheit vollständig abgebaut war. Dabei zeigten die Aktivitäten der 2-Enoyl-CoA Hydratase und L-3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase quantitativ weitgehend parallel verlaufende Veränderungen, während die Epimeraseaktivität schneller abgebaut wurde. Diese Versuchsergebnisse deuteten eine Aufteilung der drei Enzymaktivitäten auf zwei unterschiedliche Domänen des TFE an. Die Epimeraseaktivität wurde der einen Domäne, 2-Enoyl-CoA Hydratase und L-3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase der anderen Domäne der 93 kDa Untereinheit des TFE zugeordnet.

Da eine Abtrennung der Domänen voneinander unter nativen Bedingungen nicht erreicht werden konnte, wurde versucht, die strukturelle Organisation des TFE auch durch immunologische Untersuchungen zu charakterisieren. Drei Hauptfragmente (T 48, T 33 und T 26) aus tryptischer Verdauung des TFE, die zur Immunisierung in ausreichenden Mengen verfügbar waren, wurden ausgewählt, gegen die spezifische polyklonale Antiseren gewonnen wurden (3.6.3.3.1). Immunoblotting-Analysen zeigten, daß diese Antiseren unterschiedliche Spezifitäten aufwiesen: Während anti-T 48 lediglich bei den Hauptspaltprodukten T 51 und T 48 immunspezifische Anfärbungen zeigte, wurden ausschließlich T 46, T 33 und T 26 sowohl von anti-T 33 als auch anti-T 26 erkannt (Abb. 39 B-D). Zusätzlich erfolgte natürlich auch eine immunspezifische Detektion der 93 kDa Bande des TFE durch die erwähnten Antiseren, weil diese gemeinsame antigene De-

terminanten für jedes der drei Antiseren aufweisen mußte. Durch die Wahl von Antiseren gegen nur zwei tryptische Fragmente (anti-T 48 gemeinsam mit anti-T 33 oder anti-T 26) konnte demnach das gesamte Spaltmuster der identifizierbaren Hauptfragmente abgedeckt werden (Tab. 9).

Um neben der immunologischen Zuordnung der proteolytischen Fragmente des TFE auch Zuordnungen durch Homologien der Aminosäuresequenzen einzelner Spaltprodukte aufzufinden, wurde die aminoterminal Sequenzanalyse durch Edman-Abbau durchgeführt. Hierzu wurden die proteolytischen Fragmente des TFE durch reverse-phase HPLC bzw. Elektroelution im Anschluß an SDS-PAGE getrennt. Die Fragmente T 46, T 33 und T 8 lieferten die gleichen aminoterminalen Aminosäuresequenzen, während für die Spaltstücke T 51 und T 48 keine aminoterminal Sequenz ermittelt werden konnte (Tab. 10). Die beiden letzteren Fragmente repräsentieren vermutlich den aminoterminalen Bereich der 93 kDa Untereinheit des TFE, weil auch das unverdaute TFE einen blockierten NH_2 -Terminus aufweist (3.6.2).

Unter Beachtung des sequentiellen Ablaufs der Proteolyse des TFE, der Molekulargewichte der einzelnen Fragmente, der Ergebnisse aus Immunoblotting-Experimenten sowie der aminoterminalen Sequenzanalyse konnte ein Modell für den Verlauf der tryptischen Verdauung des TFE entwickelt werden (Abb. 48).

Aus diesem Abbauschema wird ersichtlich, daß die 93 kDa Untereinheit des TFE zunächst in zwei primäre Spaltprodukte geteilt wird, einer aminoterminalen (51 kDa) und einer carboxyterminalen Hälfte (46 kDa). Die Addition der Molekulargewichte entspricht wohl deswegen nicht exakt 93 kDa, weil diese streng nach der Relation ihrer Wanderungsgeschwindigkeit im Gelsystem im Vergleich zu einer nach Markerproteinen berechneten Eichgeraden ermittelt wurden und daher den üblichen Fehlergrenzen des Auflösungsvermögens von SDS-PAGE unterliegen. Aus den primären Fragmenten gehen dann bei fortschreitender Proteolyse die sekundären Spaltprodukte hervor. Auf diese Halbierung des TFE läßt sich auch die Selektivität der verschiedenen Antiseren gegenüber den unterschiedlichen Fragmenten zurückführen.

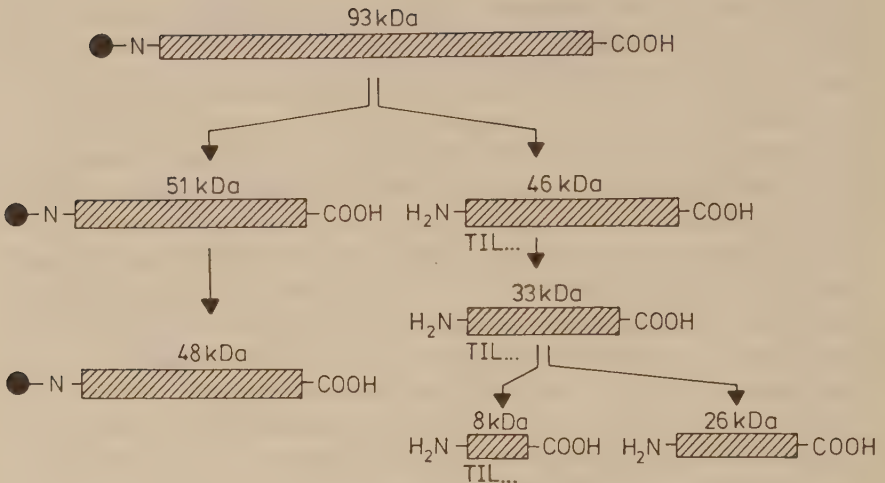


Abb. 48: Schema des sequentiellen Verlaufs der tryptischen Spaltungen des Trifunktionellen Enzyms aus *Neurospora crassa*

Die Molekulargewichte und der jeweilige Amino- bzw. Carboxyterminus der Polypeptide sind gekennzeichnet. Blockierte Aminotermini werden durch N-●, sequenzierte Aminotermini durch die ersten drei Aminosäuren angezeigt (vgl. Tab. 10).

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit wurde ein hypothetisches Modell des TFE abgeleitet. Abbildung 49 zeigt ein Modell der Struktur der 93 kDa Untereinheit des TFE, in welchem zwei Domänen über einen verknüpfenden Polypeptidkettenbereich zusammengehalten werden ("hinge region"), der besonders protease-sensitiv ist. Zusätzlich Beobachtungen ergaben eine detail-

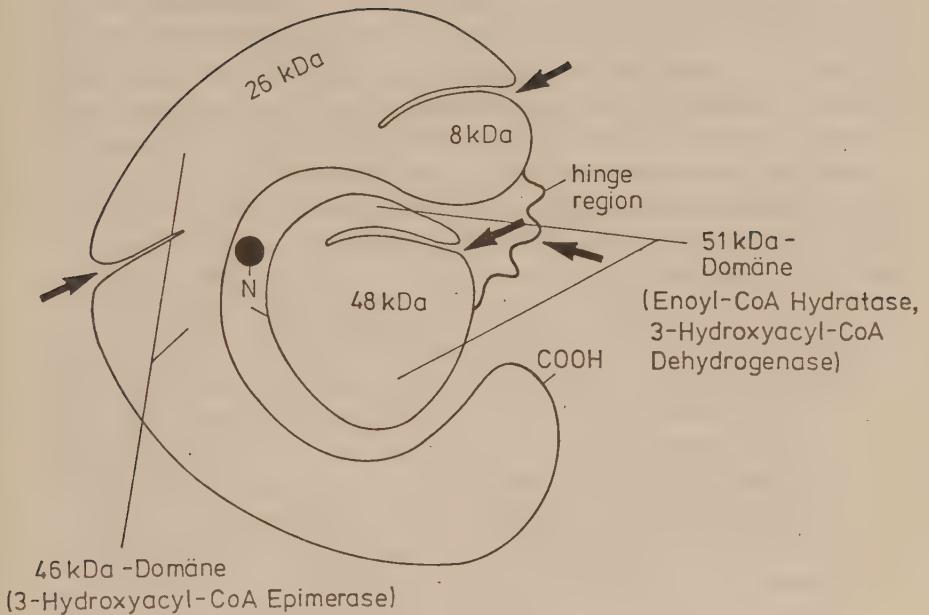


Abb. 49: Modell der 93 kDa Untereinheit des Trifunktionellen Enzyms aus *Neurospora crassa*

Eine mögliche Struktur der Untereinheit des TFE wird vorgeschlagen, bei der das TFE aus zwei strukturellen Domänen besteht, die über eine Polypeptidbrücke (hinge region) miteinander verknüpft sind. Die 46 kDa-Domäne besitzt nach diesem Modell größere Anteile an der äußeren Oberfläche der Proteinuntereinheit.

Die Hauptspaltstellen für den proteolytischen Angriff des Trypsins werden durch Pfeile markiert. Die Positionen des blockierten Aminotерминус (N-●) bzw. Carboxyterminus (-COOH) sind gekennzeichnet.

liertere Vorstellung von der Struktur des Proteins: Die immun-spezifischen Anfärbungen der aminotерминalen Fragmente erschienen wesentlich schwächer im Verhältnis zur Anfärbung der carboxyterminalen Spaltstücke (Abb. 36 und 39A). In diesen Immunoblots wurde ein Antiserum gegen TFE eingesetzt, welches durch Immunisierung mit dem nativen Protein gewonnen wurde.

Antigene Determinanten von nativen Proteinen sind "topographisch", d.h. bestehen aus bestimmten Strukturen (kontinuierlichen und diskontinuierlichen Epitopen) an der Oberfläche des Proteins. Immunologische Untersuchungen an verschiedenen Proteinen haben gezeigt, daß der größte, wenn nicht der gesamte Anteil der Proteinoberfläche Antigenizität besitzt und aus multiplen, oft überlappenden antigenen Determinanten besteht, die wiederum unterschiedliche "Immunodominanz" besitzen können (165). Der Aminoterminalus des TFE besitzt offenbar konformationsbedingt weniger antigene Determinanten für die Immunantwort und weniger Epitope für immunspezifische Reaktionen mit dem Antiserum, das gegen das native Protein gewonnen wurde, als der Carboxyterminus. Dies weist auf eine mehr oder weniger verborgene Lage der aminoterminalen Domäne in der Polypeptidkette des TFE hin. Diese Annahme wird durch die Tatsache gestärkt, daß die carboxyterminale Domäne einem relativ stärkeren proteolytischen Angriff ausgesetzt ist als vergleichsweise die NH_2 -terminale Domäne. Als Angriffspunkte für Proteasen in limitierter Proteolyse wurden exponierte Abschnitte der Polypeptidkette von Proteinen ermittelt, die entweder zwei kompakte Domänen verbinden ("hinges") oder aus einer kompakten Domäne herausgefaltet sind ("fringes") (166). Röntgenkristallographische Untersuchungen an Proteasen und Zymogenen belegen, daß die Zugänglichkeit der Proteinoberfläche von wesentlicherer Bedeutung für die Proteolyse ist als die Flexibilität bestimmter Abschnitte der Polypeptidkette zur Erzeugung von Proteasebindungsstellen (167).

Die Abhängigkeit der Proteolyse von der Konformation der Substrate wurde auch am Beispiel der limitierten Proteolyse von denaturierten Proteinproben des TFE und seiner proteolytischen Spaltprodukte deutlich. Versuche zur limitierten Proteolyse des TFE bzw. seiner tryptischen Fragmente, die nach gelelektrophoretischer Auftrennung isoliert wurden, zeigten im Vergleich zu den zuvor erwähnten Proteolysen am nativen Protein abweichende, kompliziertere Spaltmuster (3.6.3.2). Durch die Denaturierung werden offenbar neue Spaltstellen freige-

legt. Die Domänenstruktur des nativen TFE wird hierdurch indirekt unterstrichen.

Die wichtigsten Kriterien für das Vorhandensein von strukturellen Domänen im TFE scheinen somit erfüllt: Es entstehen Fragmente von definierter Größe und Zusammensetzung. Die Domänen im TFE erfüllen voneinander losgelöste Funktionen, indem sie unterschiedliche enzymatische Reaktionen katalysieren. Die Domänen besitzen eine stabile Tertiär- und auch Quartärstruktur.

Die Trennung der proteolytischen Fragmente des TFE unter Anwendung unterschiedlicher Techniken zur Trennung der Fragmente unter nicht-denaturierenden Bedingungen scheiterte (3.6.3.4). Insbesondere die Gelfiltration zeigte, daß die proteolysierten Untereinheiten nicht dissoziierten und vermutlich die Quartärstruktur des TFE beibehielten (Abb. 43). Limitierte Proteolyse und die anschließende Analyse der Proteolyseprodukte in der Abwesenheit von Reduktionsmitteln deuten darauf hin, daß weder die Fragmente noch die Untereinheiten durch Disulfidbrücken zusammengehalten werden (wird nicht gezeigt).

Nach Inkubation des proteolysierten TFE mit den spezifischen Antiseren gegen die drei verschiedenen tryptischen Fragmente konnten bei allen drei Enzymaktivitäten keine Hemmungen gemessen werden (wird nicht gezeigt). Diese Methode hätte sonst einen erfolgversprechenden Weg zur immunologischen Bestimmung der Verteilung der Enzymaktivitäten auf die Domänen des TFE dargestellt. Doppeldiffusionsanalysen nach Ouchterlony zeigten, daß diese Antiseren weder mit dem nativen noch mit dem proteolysierten TFE Immunpräzipitate bildete (Abb. 41). Immunoblots nach SDS-PAGE, in welchen die Antiseren gegen die tryptischen Fragmente eingesetzt wurden, wiesen, wie schon erwähnt, eindeutig immunspezifische Anfärbungen mit den gleichen Proteinproben auf. Diese Versuche, bei welchen Antiseren eingesetzt wurden, die durch Immunisierung von Kaninchen mit denaturierten Proteinfragmenten gewonnen wurden, weisen auf die Abhängigkeit der Immunreaktion von der Konformation der entsprechenden Antigene hin. Insbesondere die diskontinuier-

lichen Epitope, die sich durch die räumliche Nähe nicht unmittelbar auf der Polypeptidkette benachbarter Aminosäurereste gebildet haben, können durch die Denaturierung zerstört werden; neue Epitope treten auf. Ähnliche Beispiele für die geschilderte konformationsabhängige Antigenizität von Proteinen finden sich in der Literatur (168-170).

Die Befunde aus der limitierten Proteolyse legten außerdem nahe, daß die Untereinheiten des TFE wirklich identisch sind. Sie besitzen identische Molekulargewichte von 93 kDa (3.3.1) und gleiche Ladung (3.3.7). Selektive Proteolyse nichtidentischer Untereinheiten würde vermutlich nicht an der gleichen Position jedes Polypeptids stattfinden. Es konnte durch immunologische Untersuchungen begründet werden, daß sich das TFE in zwei primäre proteolytische Fragmente spaltet, deren Molekulargewichte sich zu der Größe der 93 kDa Untereinheit des TFE addieren. Die Sequenzanalyse zeigte, daß das NH_2 -terminale 51 kDa-Fragment ebenso wie das nicht proteolytierte TFE einen blockierten Aminoterminus besitzt.

Strukturelle Untersuchungen an multifunktionellen Proteinen der bisher untersuchten peroxisomalen β -Oxidationssysteme lieferten nur wenige Hinweise auf das Vorliegen von möglichen Domänenstrukturen. Ein knapper Hinweis auf die Anwendung der limitierten Proteolyse findet sich lediglich beim bifunktionellen Enzym aus Rattenleber. Durch Inkubation des Proteins mit Chymotrypsin konnte die L-3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenaseaktivität stärker inaktiviert werden als die 2-Enoyl-CoA Hydrataseaktivität. In Abhängigkeit zur verwendeten Reinigungsmethode konnte außerdem gezeigt werden, daß neben dem 78 kDa-Protein noch zwei zusätzliche Polypeptide bei 39,5 kDa und 35,1 kDa nachweisbar waren. Diese zwei zusätzlichen Polypeptide stellen vermutlich proteolytische Spaltprodukte des bifunktionellen Proteins dar (90).

Die cDNA des bifunktionellen Enzyms aus Rattenleber konnte 1985 von Osumi et al. sequenziert werden. Das Protein umfaßt nach diesen Untersuchungen 722 Aminosäuren und besitzt keine zusätzlichen terminalen Sequenzen (171). Das Gen besteht aus

7 Exons und 6 Introns. Die ersten fünf Exons bilden die codierenden Regionen bis zur Aminosäure 189 des aminoterminalen Bereichs des bifunktionellen Enzyms, die 35% Homologie zur Aminosäuresequenz der mitochondrialen Enoyl-CoA Hydratase aus Rattenleber besitzt. Die Aminosäuren 303-506 der carboxyterminalen Region des bifunktionellen Enzyms weisen andererseits 32% Homologie zur mitochondrialen 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase auf und werden lediglich von einem Exon codiert. Aufgrund dieser Versuchsergebnisse vermuteten die Autoren, daß das bifunktionelle Enzym aus Rattenleber aus zwei großen Domänen zusammengesetzt ist, die jeweils eine Enzymaktivität tragen. Wegen der signifikanten Homologien zu den mitochondrialen Enzymen wurde vermutet, daß phylogenetische Beziehungen zwischen diesen Proteinen bestehen müssen (152).

Diese Vermutungen von Osumi und Mitarbeiter über eine Domänenstruktur des bifunktionellen Proteins aus Rattenleber würden insofern strukturelle Unterschiede zu dem in der vorliegenden Arbeit vorgeschlagenen Modell des TFE aus N.crassa zeigen, als daß für das letztere Protein angenommen wurde, daß die Hydratase- und Dehydrogenaseaktivität nach den Ergebnissen der limitierten Proteolyse zusammen auf einer Domäne lokalisiert zu sein scheinen. Es wurde angenommen, daß das 51 kDa-Fragment, wie zuvor beschrieben, offenbar aufgrund seiner mehr verborgenen Lage im Molekül besonders vor proteolytischem Angriff geschützt ist. Unter Bedingungen stärkerer Proteolyse ist eine weitere Aufspaltung dieses Fragments in zwei unabhängige Domänen nicht auszuschließen.

Signifikante strukturelle Gemeinsamkeiten deuten sich durch Untersuchungen der immunologischen Kreuzreaktionen der beiden Trifunktionellen Enzyme aus N.crassa und C.tropicalis an (Abb. 39E). In Immunoblots der proteolytischen Spaltprodukte des TFE aus N.crassa mit dem Antiserum gegen das TFE aus C.tropicalis wurden, abgesehen von der 93 kDa Untereinheit, nur die aminoterminalen Fragmente T 51 und T 48 immunspezifisch angefärbt, die carboxyterminalen Fragmente dagegen nicht. Weitere immunologische Kreuzreaktionen konnten weder mit dem

gereinigten bifunktionellen Enzym der Gurkenkeimblätter noch mit anderen in Tabelle 5 aufgezeigten β -Oxidationsproteinen aus verschiedenen prokaryotischen und eukaryotischen Organismen mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden beobachtet werden.

Die vorangegangenen Ausführungen verdeutlichen, daß die Enzymausstattung des nicht-mitochondrialen, nicht-peroxisomalen β -Oxidationssystems der Microbodies von N.crassa, welche hier exemplarisch am Beispiel der Enzyme der 2. und 3. Reaktion der β -Oxidation untersucht wurde, durch die Existenz eines multifunktionellen Enzyms, dessen strukturelle Eigenschaften und katalytischen Funktionen mit den anderen bisher gereinigten multifunktionellen Proteinen verglichen wurde, eher dem peroxisomalen als dem mitochondrialen System des Fettsäureabbaus ähnelt. Demnach scheinen multifunktionelle Proteine ein charakteristisches Merkmal nicht nur speziell für die peroxisomale, sondern allgemein für die in Microbodies lokalisierte β -Oxidation zu sein. Jedoch sind weitere Beispiele zur Bewertung der Allgemeingültigkeit dieser Hypothese erforderlichlich.

Auch die 3-Oxoacyl-CoA Thiolase in N.crassa unterscheidet sich strukturell von den mitochondrialen Thiolasen (134). Ebenso wie die bisher aus Rattenleberperoxisomen (99), den Glyoxysomen von Gurkenkotyledonen (101) und den Peroxisomen von C.tropicalis, C.lipolytica und S.cerevisiae (22) gereinigten Thiolasen ist dieses Enzym ein Dimer aus Untereinheiten mit identischem Molekulargewicht. Die Untereinheit der Thiolase in N.crassa weist ein Molekulargewicht von 45 kDa auf. Sie zeigt immunologische Kreuzreaktionen mit den peroxisomalen Thiolasen der erwähnten Hefen auf.

Obwohl die molekularen Ähnlichkeiten des β -Oxidationssystems in N.crassa mit den peroxisomalen β -Oxidationssystemen beim Trifunktionellen Enzym und bei der 3-Oxoacyl-CoA Thiolase hervorgehoben wurden, bildet die Anwesenheit einer Acyl-CoA Dehydrogenase anstatt einer Acyl-CoA Oxidase eine auffallende Ausnahme gegenüber den peroxisomalen β -Oxidationssystemen,

die eher an eine Verwandtschaft mit dem mitochondrialen System denken ließ (103). In N.crassa ließen sich zwei Acyl-CoA Dehydrogenasen nachweisen, die sich in ihrer Substratspezifität unterscheiden (134). Acyl-CoA Dehydrogenase I setzt bevorzugt Acyl-CoA-Ester mittlerer Kettenlänge um und zeigt auch Aktivität gegenüber 4-cis-Decenoyl-CoA-Estern. Diesem Enzym ist daher besondere Bedeutung für den Abbau ungesättigter Fettsäuren beizumessen (vgl. Abb. 47). Acyl-CoA Dehydrogenase II setzt bevorzugt länger-kettige Acyl-CoA-Ester um. Erste Untersuchungen deuten darauf hin, daß sich diese Acyl-CoA Dehydrogenasen sowohl in ihrer molekularen Struktur als auch in dem Mechanismus der Elektronenübertragung von den mitochondrialen Acyl-CoA Dehydrogenasen unterscheiden. Während die mitochondrialen Enzyme die freiwerdenden Elektronen über ein elektronenübertragendes Flavoprotein (ETF) in die mitochondriale Atmungskette einschleusen (80,81), konnte von der Acyl-CoA Dehydrogenase in N.crassa kein elektronenübertragendes Protein abgetrennt werden (134).

Das Auffinden einer Acyl-CoA Dehydrogenase in den Glyoxysomen von N.crassa war insofern erklärbar, weil in diesen Organellen keine Katalaseaktivität nachzuweisen war (103 und Abb. 28). In den eindeutig als Microbodies identifizierten Organellen (22,134 und Abb. 30) konnte bisher keine Oxidaseaktivität bestimmt werden, so daß in diesen offenbar kein H_2O_2 -Stoffwechsel stattfindet (103). Die Identifizierung der katalasehaltigen Partikel gelang bisher nicht (134).

Untersuchungen der β -Oxidationssysteme anderer filamentöser Pilze, die in jüngster Zeit durchgeführt wurden, deuten darauf hin, daß ein nicht-mitochondriales, nicht-peroxisomales β -Oxidationssystem offenbar nicht nur einen Sonderfall darstellt, der auf N.crassa beschränkt bleibt. In Aspergillus tamarii, Podospora anserina, Botrytis cineria, Cladosporium resinae und Helminthosporium spec. scheint die erste Reaktion der induzierbaren β -Oxidation ebenfalls von einer Acyl-CoA Dehydrogenase katalysiert zu werden, während Acyl-CoA Oxidaseaktivität nicht bestimmt werden konnte (22,134). Ein Nachweis der

intrazellulären Lokalisation steht in diesen Fällen jedoch noch aus. Interessanterweise konnte in Aspergillus tamarii, wie schon zuvor erwähnt, ein Hauptteil der Katalaseaktivität ebenfalls in Partikeln, die in Fraktionen höherer Dichte ($1,26 \text{ g/cm}^3$) als die Microbodies im Saccharosegradienten sedimentierten (34) sowie die Existenz eines trifunktionellen Enzyms (149) nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden außerdem Versuche zur Biosynthese des Trifunktionellen Enzyms aus N.crassa dargestellt (3.7). Die Induktion der Enzymaktivitäten scheint eine Folge der vermehrten Proteinsynthese zu sein. Die Aktivitäten der β -Oxidationsenzyme war in saccharosegewachsenen Hyphen relativ gering im Vergleich zu denen in ölsäuregewachsenen Zellen (103). In Rohextrakten von Zellen, die auf Saccharose als einziger Kohlenstoffquelle gewachsen waren, konnte das Trifunktionelle Enzym weder durch Immunoblotting noch durch indirekte Immunpräzipitation nachgewiesen werden. Dieser Nachweis gelang erst nach Induktion der β -Oxidation durch Wachstum der Hyphen auf Ölsäure (Abb. 46). Die gesteigerte Biosynthese des TFE ist offenbar eine Folge der Zunahme der translatierbaren mRNA. Das in vitro Translationsprodukt des TFE konnte nur in Translationsansätzen, die von mRNA aus oleatinduzierten Zellen von N.crassa programmiert wurden, identifiziert werden. Die Ansätze, in welchen mRNA aus saccharosegewachsenen Hyphen verwendet wurde, wiesen kein immunologisch nachweisbares in vitro Translationsprodukt des TFE auf (3.7.4). Die Regulation der Induktion erfolgt nach diesen Befunden vermutlich auf der Ebene der Transkription.

Das in vitro Translationsprodukt des TFE im Retikulocytenlysesystem besitzt die Größe der reifen Proteinuntereinheit von 93 kDa (3.7.3). Das beweist jedoch nicht eindeutig, daß das Translationsprodukt mit der reifen Proteinuntereinheit identisch ist. Sie könnten sich in der Anzahl weniger Aminosäuren unterscheiden, ohne daß das in SDS-PAGE erkannt wird. Viele mögliche Modifizierungen der Primärstruktur wie Acetylierung, Phosphorylierung oder geringfügige Glykosylierung würden die

elektrophoretische Mobilität eines Proteins nicht beeinflussen. Außerdem könnten sich einige Modifizierungen (z.B. Glykosylierung und proteolytisches Processing) in ihrem Effekt auf die elektrophoretische Beweglichkeit gegenseitig ausgleichen. Limitierte Proteolyse wäre auch hier eine geeignete Methode zum Vergleich der Strukturen des Translationsproduktes mit der reifen Proteinuntereinheit des TFE.

Sowohl die in den Glyoxysomen von N.crassa lokalisierte Thiolase als auch die Katalase werden im Retikulozytenlysatsystem ebenfalls in der Größe ihrer reifen Proteinuntereinheiten synthetisiert (134).

Auch die in vitro Translationsprodukte der multifunktionellen Enzyme aus Rattenleber (83,172), Gurkenkotyledonen (173) und C.tropicalis (174) weisen ebenfalls keine Größenunterschiede zu den Molekulargewichten der Untereinheiten der reifen Proteine auf. Im Fall des bifunktionellen Proteins aus Rattenleber konnte durch Klonierung und Sequenzierung der cDNA eindeutig belegt werden, daß innerhalb des "open reading frame" keine zusätzlichen Aminosäuresequenzen auftreten (171). In der Gruppe der peroxisomalen β -Oxidationsenzyme, in welchen die Biosynthese untersucht wurde, zeigen lediglich die Precursor der 3-Oxoacyl-CoA Thiolase aus Rattenleberperoxisomen (175) und den Glyoxysomen der Gurkenkotyledonen (176) ein größeres Molekulargewicht als die reife Proteinuntereinheit. Der Precursor der Thiolase aus Rattenleberperoxisomen besitzt eine aminoterminal Präsequenz von 26 Aminosäureestern (152).

Bis auf einige Ausnahmen werden die mitochondrialen Proteine, die von der DNA des Zellkerns codiert werden, als Precursor mit einer zusätzlichen aminoterminalen Aminosäuresequenz synthetisiert. Auch die mitochondrialen β -Oxidationsenzyme weisen solche zusätzlichen Sequenzen auf (177,178). Lediglich die 3-Oxoacyl-CoA Thiolase wird im Gegensatz zur peroxisomalen Thiolase in der Größe der reifen Proteinuntereinheit synthetisiert (177,179). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde versucht, das in vitro Translationsprodukt der mitochondrialen Enoyl-CoA Hydratase aus N.crassa zu identifizieren.

Erste Versuche deuten darauf hin, daß das mitochondriale Protein im Retikuloctenlysatsystem von poly A-RNA sowohl aus saccharose- als auch aus ölsäuregewachsenen Hyphen translatiert wird und in Form eines Precursors mit einer von der reifen Proteinuntereinheit abweichenden Größe nachweisbar ist (wird nicht gezeigt). Ein schlüssiger Nachweis der Identität des Immunpräzipitats mit der Enoyl-CoA Hydratase gelang jedoch nicht.

Die Synthese der mitochondrialen Proteine erfolgt an freien Polysomen, und die vollständigen Polypeptidketten werden im Cytosol freigesetzt. Der Import der Proteine erfolgt posttranslational und erfordert Energie in Form eines elektrochemischen Membranpotentials entlang der inneren Mitochondrienmembran. Die Präsequenz (Signalsequenz) der mitochondrialen Proteine ist für die Erkennung des mitochondrialen Kompartiments verantwortlich und wird durch eine Signalpeptidase in der Matrix abgespalten (180-182).

Alle Proteine der Microbodies, in denen die Biosynthese so weitreichend untersucht wurde, werden an freien Polysomen synthetisiert. Das gilt für die Matrixproteine (183,184) und konnte auch für ein 22 kDa integrales Membranprotein aus Rattenleberperoxisomen nachgewiesen werden (184). Soweit untersucht wurde, durchlaufen die Proteine nach ihrer Synthese zunächst einen cytosolischen Pool und werden demnach posttranslational importiert. Das Endoplasmatische Retikulum ist aller Wahrscheinlichkeit nach nicht am Importgeschehen beteiligt (185,186).

Die meisten der in Microbodies lokalisierten Proteine werden (wie das TFE in N.crassa) in der Größe ihrer reifen Proteinuntereinheiten synthetisiert. In den wenigen Fällen, in welchen der Import von Precursor mit höheren Molekulargewichten untersucht wurde, konnte keine unmittelbare Beziehung zwischen der Abspaltung der zusätzlichen Sequenz und dem Import erkannt werden (172,187,188). Über die für den Import benötigte Energie ist bisher wenig bekannt. Auf die Abhängigkeit der Effizienz des in vitro Imports peroxisomaler Proteine in

Rattenleberperoxisomen von ATP wurde kürzlich hingewiesen (189). Die Lokalisation einer ATPase in den Peroxisomen von Hansenula polymorpha und ihre Beteiligung an der Ausbildung eines pH-Gradienten entlang der Membran konnte wahrscheinlich gemacht werden (190).

Der Nachweis eines Signals in der Struktur der cytosolischen Precursor, das für den Erkennungsprozeß zwischen Precursor und Microbody verantwortlich ist, ist Gegenstand aktueller Studien in zahlreichen Laboratorien. Die in Microbodies lokalisierten Proteine besitzen häufig einen isoelektrischen Punkt im basischen Bereich (das TFE aus N.crassa ist dafür ein weiteres Beispiel), oder, wie strukturelle Analysen von klonierter cDNA belegen, Sequenzen mit Anhäufungen ("clusters") positiver Ladungen (171,191,192). Untersuchungen mit Proteinen aus Glyoxysomen der Tryposomatidae erbrachten ein Modell, in welchem zwei in einem definierten Abstand befindliche Kationen-"Cluster" Signalfunktionen tragen (193).

Nach dem heutigen Erkenntnisstand wird die Biogenese der Microbodies wie folgt erklärt: sowohl die Matrix- als auch die Membranproteine werden an den freien Polysomen ohne Beteiligung des Endoplasmatischen Retikulums synthetisiert und posttranslational in bereits bestehende Microbodies importiert. Dieser Aufnahme von neuen Proteinen entsprechend wachsen die Organellen und teilen sich schließlich, um neue Microbodies zu bilden (183,194).

Dieses Modell der Biogenese setzt voraus, daß Microbodies nicht de novo entstehen, und jede Zelle daher zumindest ein Microbody besitzen muß. Die Verbesserung elektronenmikroskopischer Techniken, insbesondere die Anwendung von ultradünnen Serienschnitten sowie immunocytochemischer Anfärbungen, machte zumindest in Hefezellen die Anwesenheit von mindestens einem Microbody auch unter reprimierenden Wachstumsbedingungen, von dem sich durch Teilung neue Microbodies ausbilden, wahrscheinlich (195).

Auf die Frage nach dem Ursprung des ersten Microbody kann es momentan nur spekulative Antworten geben. De Duve stellte die

Möglichkeit heraus, daß der phylogenetische Ursprung dieses Organells möglicherweise in Analogie zu den Mitochondrien und Chloroplasten in der Aufnahme eines prokaryotischen Endosymbionten in einer frühen Entwicklungsphase der eukaryotischen Zelle begründet ist (25). Von den Mitochondrien und Chloroplasten aber unterscheiden sich die Microbodies durch die vollständige Abwesenheit von DNA sowie die Tatsache, daß die Organellen nur von einer einzigen Membran umschlossen sind.

Zukünftige Arbeiten werden sich insbesondere mit der Biosynthese der Matrix- und Membranproteine der Microbodies beschäftigen. Über die Sequenzierung der Gene können Einblicke in die Regulation der Biosynthese der Microbodyproteine erhalten werden. Die Ermittlung der Aminosäuresequenzen der Proteine und der Vergleich dieser Sequenzen mit anderen Zellproteinen wird zur Aufklärung der topogenen Signale für die Steuerung der Proteine zum Kompartiment der Microbodies und Aufnahme in das Zellorganell bzw. Integration in dessen Membranen beitragen. Das β -Oxidationssystem von N.crassa scheint für solche Untersuchungen ein geeignetes Modellsystem zu sein. Grundlegende Voraussetzungen für die Untersuchungen zur Biogenese der Microbodies konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit geschaffen werden.

Die Beschäftigung mit der Biogenese der Microbodies hat mit der Entdeckung genetisch bedingter Erkrankungen, in welchen peroxisomale Funktionen gestört sind, medizinische Bedeutung gewonnen (196). Ein Beispiel hierfür ist das Zellweger Syndrom, eine seltene autosomal rezessive Erkrankung des Menschen, bei welcher eine vollständige Abwesenheit von Peroxisomen in Leber- und Nierenzellen beobachtet wird (197).

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Das nicht-mitochondriale, aber auch nicht-peroxisomale β -Oxidationssystem von N.crassa wurde molekular untersucht und mit Enzymen aus mitochondrialen und peroxisomalen β -Oxidationssystemen verglichen.
2. Ein multifunktionelles Protein, das die Enzymaktivitäten 2-Enoyl-CoA Hydratase, L-3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase und 3-Hydroxyacyl-CoA Epimerase trägt, konnte durch Kationenaustauschchromatographie, "dye-ligand"-Chromatographie und Adsorptionschromatographie ca. 340fach angereichert und zur Homogenität gereinigt werden. Das native Enzym besitzt ein Molekulargewicht von 365.000 und besteht aus Untereinheiten mit identischem Molekulargewicht von
3. Eine zweite 2-Enoyl-CoA Hydratase konnte durch vier Reinigungsschritte, die Kationenaustausch-, Adsorptions- und "dye-ligand"-Chromatographie umfaßten, 917fach angereichert werden. Das zur Homogenität gereinigte Protein ist ein Hexamer mit einem Molekulargewicht von 182.000. Die Untereinheiten weisen ein Molekulargewicht von 309.000 auf.
4. Gegen das Trifunktionelle Enzym und die 2-Enoyl-CoA Hydratase konnten durch Immunisierung von Kaninchen monospezifische Antiseren gewonnen werden. Die beiden Enzyme zeigen keine immunologische Kreuzreaktionen.
5. 3-cis,2-trans-Enoyl-CoA Isomerase konnte von den Aktivitäten des Trifunktionellen Enzyms abgetrennt werden. Nach drei Reinigungsschritten wurde das Protein 155fach angereichert.
6. Die intrazelluläre Lokalisation der drei Enzyme wurde durch isopyknische Zentrifugation eines Rohextraktes im Saccharosegradienten untersucht. Das Trifunktionelle Enzym und die 3-cis,2-trans-Enoyl-CoA Isomerase wurden in

den glyoxysomalen, die 2-Enoyl-CoA Hydratase in den mitochondrialen Fraktionen nachgewiesen.

7. Osmotischer Aufschluß der Glyoxysomen mit anschließender Abtrennung der Membran- von der Matrixfraktion sowie immunocytochemische Untersuchungen deuten darauf hin, daß ein signifikanter Anteil des Trifunktionellen Enzyms an der peripheren Matrix der Microbodies lokalisiert ist.
8. Das Trifunktionelle Enzym wurde durch Anwendung von limitierter Proteolyse strukturell charakterisiert. Spezifische Antiseren konnten gegen drei tryptische Fragmente des Enzyms (T 48, T 33 und T 26) gewonnen werden. Ein Fragmentierungsschema der tryptischen Spaltungen des TFE sowie ein strukturelles Modell der 93 kDa Untereinheit, das eine Domänenstruktur des TFE impliziert, konnten nach den Ergebnissen immunologischer Untersuchungen und aminoterminaler Sequenzanalyse vorgestellt werden. Diese Methoden machen es wahrscheinlich, daß das TFE aus identischen Untereinheiten aufgebaut ist.
9. Zur Untersuchung der Biosynthese des Trifunktionellen Enzyms konnte poly A-RNA aus saccharose- und ölsäuregewachsenen Hyphen von N.crassa isoliert und im Retikulozytenlysatsystem in vitro translatiert werden.
10. Der Nachweis des L-(³⁵S)-Methionin-markierten in vitro Translationsproduktes des TFE gelang durch indirekte Immunpräzipitation mit dem spezifischen Antiserum des gereinigten Proteins. Das Molekulargewicht des Precursors unterscheidet sich in SDS-PAGE nicht von der reifen Proteinuntereinheit des gereinigten bzw. in vivo L-(³⁵S)-Methionin-markierten TFE.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Knoop, F. (1904)
Beitr. Chem. Physiol. Pathol. 6., 150-162
- (2) Lynen, F. (1952-53)
Harvey Lect. 48, 210-244
- (3) Lynen, F. (1955)
Ann. Rev. Biochem. 24, 653-688
- (4) Stoffel, W. (1966)
Naturwissenschaften 53, 621-630
- (5) Stoffel W., Ditzer, R. und Caesar, H. (1964)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 339, 167-181
- (6) Davidoff, F. und Korn, D. (1965)
J. Biol. Chem. 240, 1549-1558
- (7) Struijk, C.B. und Beerthuis, R.K. (1966)
Biochim. Biophys. Acta 116, 12 -22
- (8) Stoffel, W. und Caesar, H. (1965)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 341, 76-83
- (9) Wakil, S.J. und Mahler, H.R. (1954)
J. Biol. Chem. 207, 125-132
- (10) Kunau, W.-H. und Bartnik, F. (1974)
Eur. J. Biochem. 48, 311-318
- (11) Dommes, V., Luster, W., Cvetanović, M. und Kunau, W.-H.
(1982)
Eur. J. Biochem. 125, 335-341
- (12) Dommes, V., Baumgart, C. und Kunau, W.-H. (1981)
J. Biol. Chem. 256, 8259-8262
- (13) Dommes, P., Dommes, V. und Kunau, W.-H. (1983)
J. Biol. Chem. 258, 10846-10852
- (14) Mizugaki, M., Kimura, C., Nishimaki, T., Yamamoto, H.,
Sagi, M., Nishimura, S. und Yamanaka, H. (1982)
J. Biochem. (Tokyo) 92, 1671-1674
- (15) Overath, P., Raufuss, E.-M., Stoffel, W. und Ecker, W.
(1967)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 29, 28-33
- (16) Weeks, G., Shapiro, M., Burns, R.O. und Wakil, S.J.
(1969)
J. Bacteriol. 97, 827-836

- (17) Binstock, J.F., Pramanik, A. und Schulz, H. (1977)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 492-495
- (18) Pramanik, A., Pawar, S., Antonian, E. und Schulz, H.
(1979)
J. Bacteriol. 137, 469-473
- (19) Pawar, S. und Schulz, H. (1981)
J. Biol. Chem. 256, 3894-3899
- (20) Yang, S.-Y. und Schulz, H. (1983)
J. Biol. Chem. 258, 9780-9785
- (21) Overath, P., Pauli, G. und Schairer, H.U. (1969)
Eur. J. Biochem. 7, 559-574
- (22) Kunau, W.-H., Kionka, C., Ledebur, A., Matchlowski, M.,
Moreno de la Garza, M., Schultz-Borchard, U.,
Thieringer, R. und Veenhuis, M. (1987)
in: Peroxisomes in Biology and Medicine, ed. H.D. Fahimi,
H. Sies, Springer-Verlag, 128-140
- (23) Burmann, C., Schröder, M. und Kunau, W.-H. (1987)
unveröffentlichte Ergebnisse
- (24) Rhodin, J. (1954)
PhD thesis, Aktiebolaget Godvil, Stockholm
- (25) De Duve, C. (1983)
Sci. Amer. 248, 74-84
- (26) Osmundsen, H., Thomassen, M.S., Hiltunen, J.K. und Berge, R.K.
(1987)
in: Peroxisomes in Biology and Medicine, ed. H.D. Fahimi,
H. Sies, Springer-Verlag, 152-165
- (27) De Duve, C. und Baudhuin, P. (1966)
Physiol. Rev. 46, 323-357
- (28) De Duve, C. (1975)
Science 189, 186-194
- (29) Breidenbach, R.W. und Beevers, H. (1967)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 27, 462-469
- (30) Beevers, H. (1969)
Ann. N.Y. Acad. Sci. 168, 313-324
- (31) Müller, M., Hogg, J.F. und de Duve, D. (1968)
J. Biol. Chem. 243, 5385-5395
- (32) Graves, L.B. und Becker, W.M. (1974)
J. Protozool. 21, 771-774

- (33) Fukui, S. und Tanaka, A. (1979)
J. Appl. Biochem. 1, 171-201
- (34) Graves, L.B.Jr., Armentrout, V.N. und Maxwell, D.P.
(1976)
Planta 132, 143-148
- (35) Kobr, M.J., Vanderhaeghe, F. und Combépine, G. (1969)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 640-645
- (36) Kobr, M.J. und Vanderhaeghe, F. (1973)
Experientia 29, 1221-1223
- (37) O'Sullivan, J. und Casselton, P.J. (1973)
J. Gen. Microbiol. 75, 333-337
- (38) Jones, R.G., Davis, W.L. und Goodman, D.B.P. (1982)
Ann. N. Y. Acad. Sci. 386, 165-169
- (39) Tolbert, N.E. (1981)
Ann. Rev. Biochem. 50, 133-157
- (40) Trelease, R.N., Becker, W.M., Gruber, P.J. und
Newcomb, E.H. (1971)
Plant Physiol. 48, 461-475
- (41) Köller, W. und Kindl, H. (1978)
Z. Naturforsch. 33, 962-968
- (42) Beevers, H. (1979)
Ann. Rev. Plant Physiol. 30, 159-193
- (43) Burke, J.J. und Trelease, R.N. (1975)
Plant Physiol. 56, 710-717
- (44) Schopfer, D., Bajracharya, D., Bergfeld, R. und
Falk, H. (1976)
Planta 133, 73-80
- (45) Titus, D.E. und Becker, W.M. (1985)
J. Cell. Biol. 101, 1288-1299
- (46) Nishimura, M., Yamaguchi, J., Mori, H., Akazawa, T.
und Yokota, S. (1986)
Plant Physiol. 81, 313-316
- (47) Novikoff, A.B., Novikoff, P.M., Davis, C. und
Quintana, N. (1973)
J. Histochem. Cytochem. 21, 737-755
- (48) Russo, J.J. und Black, V.H. (1982)
J. Biol. Chem. 257, 3883-3889
- (49) Connock, M.J. und Perry, S.R. (1983)
Biochem. Int. 6, 545-551

- (50) Gorgas, K. (1984)
Anat. Embryol. 169, 261-270
- (51) Oppenheimer, F.R. (1984)
FEBS Lett. 169, 35-39
- (52) Hart, D.T. und Oppenheimer, F.R. (1984)
Mol. Biochem. Parasitol. 13, 159-172
- (53) Lazarow, P.B. und de Duve, C. (1976)
Proc. Natl. Acad. Sci. 73, 2043-2046
- (54) Cooper, T.G. und Beevers, H. (1969)
J. Biol. Chem. 244, 3514-3520
- (55) Blum, J.J. (1973)
J. Protozool. 20, 688-692
- (56) Hryb, D.J. und Hogg, J.F. (1976)
Fed. Proc. 35, 1501
- (57) Stabenau, H., Winkler, U. und Säftel, W. (1984)
Plant, Physiol. 75, 531-533
- (58) Kawamoto, S., Nozaki, C., Tanaka, A. und Fukui, S.
(1978)
Eur. J. Biochem. 83, 609-613
- (59) Kawamoto, S., Tanaka, A., Yamamura, M., Terashima, Y.
und Fukui, S. (1977)
Arch. Microbiol. 112, 1-8
- (60) Mishina, M., Kamiryo, T., Tashiro, S., Hagihara, T.,
Tanaka, A., Fukui, S. und Numa, S. (1978)
Eur. J. Biochem. 89, 321-328
- (61) Tanaka, A., Osumi, M. und Fukui, S. (1982)
Ann. N. Y. Acad. Sci. 386, 188-199
- (62) Mateblowski, M., Schultz-Borchard, U., Douma, A.,
Veenhuis, M. und Kunau, W.-H. (1986)
Eur. J. Cell. Biol. 41, Suppl. 14, 28
- (63) Markwell, M.A.K., Tolbert, N.E. und Beiber, L.L. (1976)
Arch. Biochem. Biophys. 176, 479-488
- (64) Miyazawa, S., Ozasa, H., Osumi, T. und Hashimoto, T.
(1983)
J. Biochem. 94, 529-542
- (65) Kawamoto, S., Ueda, M., Nozaki, C., Yamamura, M.,
Tanaka, A. und Fukui, S. (1978)
FEBS-Lett. 96, 37-40
- (66) Hess, R., Stäubli, W. und Reiss, W. (1965)
Nature 208, 856-858

- (67) Reddy, J.K., Warren, J.R., Reddy, M.K. und Lalwani, N.D. (1982)
Ann. N. Y. Acad. Sci. 386, 81-110
- (68) Reddy, J.K. und Kumar, N.S. (1979)
J. Biochem. 85, 847-856
- (69) Reddy, J.K., Goel, S.K., Namali, M.R., Carrino, J.J., Laffler, T.G., Reddy, M.K., Sperbeck, S.J., Osumi, T., Hashimoto, T., Lalwani, N.D. und Rao, M.S. (1986)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 1747-1751
- (70) Reddy, J.K., Rao, M.S., Lalwani, N.D., Reddy, M.K., Nemali, M.R. und Alvares, K. (1987)
in: Peroxisomes in Biology and Medicine, ed. H.D. Fahimi, H. Sies, Springer-Verlag, 255-262
- (71) Gerhardt, B. (1987)
in: Peroxisomes in Biology and Medicine, ed. H.D. Fahimi, H. Sies, Springer-Verlag, 141-151
- (72) Wood, C., Burgess, N. und Thomas, D.R. (1986)
Planta 167, 54-57
- (73) Beinert, H. (1962)
Methods Enzymol. 5, 546-557
- (74) Hall, C.L. (1978)
Methods Enzymol. 53, 502-518
- (75) Dommes, V. und Kunau, W.-H. (1984)
J. Biol. Chem. 259, 1789-1997
- (76) Furuta, S., Miyazawa, S. und Hashimoto, T. (1981)
J. Biochem. 90, 1739-1750
- (77) Ikeda, Y., Dabrowski, C. und Tanaka, K. (1983)
J. Biol. Chem. 258, 1066-1076
- (78) Thorpe, C., Matthews, R.G. und Williams, C.H. (1979)
Biochemistry 18, 331-337
- (79) Davidson, B. und Schulz, H. (1982)
Arch. Biochem. Biophys. 213, 155-162
- (80) Crane, F.L. und Beinert, H. (1956)
J. Biol. Chem. 218, 717-731
- (81) Ruzicka, F.J. und Beinert, H. (1977)
J. Biol. Chem. 252, 8440-8445
- (82) Osumi, T., Hashimoto, T. und Ui, N. (1980)
J. Biochem. 87, 1735-1746
- (83) Rachubinski, R.A., Fujiki, Y., Mortensen, R.M. und Lazarow, P.B. (1984)
J. Cell Biol. 99, 2241-2246

- (84) Miura, S., Mori, M., Takiguchi, M., Tatibana, M., Furuta, S., Miyazawa, S. und Hashimoto, T. (1984)
J. Biol. Chem. 259, 6397-6402
- (85) Furuta, S., Miyazawa, S. und Hashimoto, T. (1982)
J. Biochem. 92, 319-326
- (86) Fujiki, Y. und Lazarow, P.B. (1985)
J. Biol. Chem. 260, 5603-5609
- (87) Hashimoto, T. (1982)
Ann. N. Y. Acad. Sci. 386, 5-12
- (88) Kirsch, T., Löffler, H.-H. und Kindl, H. (1986)
J. Biol. Chem. 261, 8570-8576
- (89) Steinman, H.M. und Hill, R.L. (1975)
in: Methods of Enzymology 35, ed. J.M. Lowenstein,
Academic Press, New York, 136-151
- (90) Furuta, S., Miyazawa, S. Osumi, T., Hashimoto, T.
und Ui, N. (1980)
J. Biochem. 88, 1059-1070
- (91) Fong, J.C. und Schulz, H. (1977)
J. Biol. Chem. 252, 542-547
- (92) Noyes, B. und Bradshaw, R.A. (1973)
J. Biol. Chem. 248, 3052-3059
- (93) Osumi, T. und Hashimoto, T. (1980)
Arch. Biochem. Biophys. 203, 372-383
- (94) Osumi, T. und Hashimoto, T. (1979)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 89, 580-584
- (95) Frevert, J. und Kindl, H. (1980)
Eur. J. Biochem. 107, 79-86
- (96) Moreno de la Garza, M., Schultz-Borchard, U.,
Crabb, J.W. und Kunau, W.-H. (1985)
Eur. J. Biochem. 148, 285-291
- (97) Middleton, B. (1972)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 508-515
- (98) Middleton, B. (1973)
Biochem. J. 132, 717-730
- (99) Miyazawa, S., Osumi, T. und Hashimoto, T. (1980)
Eur. J. Biochem. 103, 589-596

- (100) Staak, H., Binstock, J.F. und Schulz, H. (1978)
J. Biol. Chem. 253, 1827-1831
- (101) Frevert, J. und Kindl, H. (1980)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 537-542
- (102) Blobel, G. (1980)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1496-1500
- (103) Kionka, C. und Kunau, W.-H. (1985)
J. Bacteriol. 161, 153-157
- (104) Theimer, R.R., Wanner, G. und Anding, G. (1978)
Eur. J. Cell. Biol. 18, 132-144
- (105) Wanner, G. und Theimer, R.R. (1982)
Ann. N. Y. Acad. Sci. 368, 269-284
- (106) Kunau, W.-H. und Dommes, P. (1978)
Eur. J. Biochem. 91, 533-544
- (107) Vogel, H.J. (1964)
Am. Nat. 98, 435-446
- (108) Lämmli, U.K. (1970)
Nature 227, 680-685
- (109) Hunkapiller, M. und Hood, L. (1983)
Meth. Enzymol. 91, 227-236
- (110) O'Farrell, P.H. (1975)
J. Biol. Chem. 250, 4007-4021
- (111) Peters, K.E. und Comings, D.E. (1980)
J. Cell Biol. 86, 135-155
- (112) O'Farrell, P.Z., Goodman, H.M. und O'Farrell, P.H.
(1977)
Cell 12, 1133-1142
- (113) Cleveland, D.W., Fischer, S.G., Kirschner, M.W.
und Lämmli, U.K. (1977)
J. Biol. Chem. 252, 1102-1106
- (114) Ouchterlony, O. (1962)
Progr. Allergy 6, 30-154
- (115) Grabar, P. und Williams, C.A. (1953)
Biochem. Biophys. Acta 10, 193-198
- (116) Sewell, M.M.H. (1967)
LKB Instrument Journal: Science Tools 14, 11

- (117) Olliver, C.L. und Boyd, C.D. (1984)
in: Methods in Molecular Biology, Vol. 2:
Nucleic Acids, ed. J.M. Walker, Humana Press,
Clifton, New Jersey, 157-160
- (118) Towbin, H. und Gordon, I. (1984)
J. Immunol. Meth. 72, 313-340
- (119) Olmstedt, I.B. (1981)
J. Biol. Chem. 256, 11955-11957
- (120) Pelham, H.R.B. und Jackson, R.J. (1976)
Eur. J. Biochem. 67, 247-256
- (121) Palmiter, R.D. (1973)
J. Biol. Chem. 248, 2095-2106
- (122) Glisin, V., Crkvenjakov, R. und Byus, C. (1974)
Biochemistry 13, 2633-2637
- (123) Aviv, H. und Leder, P. (1972)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1409-1412
- (124) Maniatis, T., Fritsch, E.F. und Sambrook, J. (1982)
Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, 197
- (125) Bradford, M.M. (1976)
Analyt. Biochem. 72, 248-254
- (126) Dommes, V. und Kunau, W.-H. (1976)
Anal. Biochem. 71, 571-578
- (127) Middleton, B. (1973)
Biochem. J. 132, 717-730
- (128) Moreno de la Garza, M., Schultz-Borchard, U., Crabb, J.W.
und Kunau, W.-H. (1985)
Eur. J. Biochem. 148, 285-291
- (129) Dixon, G.H. und Kornberg, H.L. (1959)
Biochem. J. 72, 3
- (130) Aebi, H. (1974)
in: H.U. Bergmeyer (ed.), Methoden der enzymatischen
Analyse, 3rd ed., Weinheim 1974, 713-718
- (131) Bergmeyer, H.U., Gawehn, K. und Grassl, M. (1974)
in: H.U. Bergmeyer (ed.), Methoden der enzymatischen
Analyse, 3rd ed., Weinheim 1974, 479-480
- (132) Bidlingmeyer, B.A., Cohen, S.A. und Tarvin, T.L. (1984)
J. Chromatogr. 336, 93-104

- (133) Tarr, G.E. (1984)
in: Shively, J.E. (ed.), Microcharacterization of
Polypeptides: A Practical Manual, Humana Press,
New Jersey 1986, 155-194
- (134) Kionka, C. (1986)
Dissertation, Ruhr-Universität Bochum
- (135) Travis, J. Bowen, J. und Tewksbury (1976)
Biochem. J. 157, 301-306
- (136) Swart, A.C.W. und Henker, H.C. (1970)
Biochim. Biophys. Acta 222, 692-695
- (137) Shapiro, A.L., Vinuela, E. und Maizel, J.V. (1967)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 815-820
- (138) Andrews, P. (1965)
Biochem. J. 96, 595-606
- (139) Robinson, A.B. (1974)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 885-888
- (140) Kionka, C., Veenhuis, M. und Kunau, W.-H. (1986)
International Symposium on Peroxisomes in Biology
and Medicine, Heidelberg, Abstracts p. 23
- (141) Ledebur, A., Kionka, C., Veenhuis, M. und Kunau, W.-H.
(1986)
Eur. Cell Biol. 41, Suppl. 14, 26
- (142) Fujiki, Y., Hubbard, A.L., Fowler, S. und Lazarow, P.B.
(1982)
J. Cell Biol. 93, 97-102
- (143) Köller, W. und Kindl, H. (1977)
Arch. Biochem. Biophys. 181, 236-248
- (144) Singer, S.J. und Nicolson, G.L. (1972)
Science 175, 720-731
- (145) Meyer, H.E., Swiderek, K., Hoffmann-Posorske, E.,
Korte, H. und Heilmeyer, L.M.G. (1987)
J. Chromat., in press
- (146) Swank, T. und Munkey, N. (1973)
Anal. Biochem. 39, 462-477
- (147) Mortensen, R.M., Rachubinski, R.A., Fujiki, Y. und
Lazarow, P.B. (1984)
Biochem. J. 223, 547-550
- (148) Hii, V. und Courtright, J.B. (1982)
J. Bacteriol. 150, 981-983

- (149) Bühne, S. und Kunau, W.-H. (1987)
unveröffentlichte Ergebnisse
- (150) Thieringer, R., Behrends, W., Kunau, W.-H. und Kindl, H. (1987)
Eur. J. Biochem., in prep.
- (151) Moreno de la Garza, M. und Kunau, W.-H. (1987)
unveröffentlichte Ergebnisse
- (152) Osumi, T., Hijikata, M., Ishii, N., Miyazawa, S. und Hashimoto, T. (1987)
in: Peroxisomes in Biology and Medicine, ed. H.D. Fahimi, H. Sies, Springer-Verlag, 105-114
- (153) Meister, A. (ed.) (1968)
in: Biochemistry of Amino Acids, 2nd Ed., Academic Press, New York, 729
- (154) Maxwell, D.P., Armentrout, V.N. und Graves, L.B. (1977)
Ann. Rev. Phytopathol. 15, 119-134
- (155) Kunigk, I. und Kunau, W.-H. (1987)
unveröffentlichte Ergebnisse
- (156) Chu, C.H. und Schulz, H. (1985)
FEBS Lett. 185, 129-134
- (157) Yang, S.-Y., Cuebas, D. und Schulz, H. (1986)
J. Biol. Chem. 261, 12238-12243
- (158) Yang, S.-Y., Cuebas, D. und Schulz, H. (1986)
J. Biol. Chem. 261, 15390-15395
- (159) Kirschner, K. und Bisswanger, H. (1976)
Ann. Rev. Biochem. 45, 143-166
- (160) Schmincke-Ott, E. und Bisswanger, H. (1978)
in: Multifunctional Proteins, ed. Bisswanger, H., Schmincke-Ott, E., John Wiley and Sons, New York, 1-29
- (161) Mattick, J.S., Tsukamoto, Y., Nickless, J. und Wakil, S.J. (1983)
J. Biol. Chem. 258, 15291-15299
- (162) Matthew, R.G., Vanoni, M.A., Hanifeld, J.F. und Wall, J. (1984)
J. Biol. Chem. 259, 11647-11650
- (163) Walker, M.S. und De Moss, J.A. (1983)
J. Biol. Chem. 258, 3571-3575

- (164) Grayson, D.R. und Evans, D.R. (1983)
J. Biol. Chem. 258, 4123-4129
- (165) Benjamin, D.C., Berzofsky, J.A., East, I.J.,
Gurd, F.R.N., Hannum, C., Leach, S.J., Margoliash, E.,
Michael, J.G., Miller, A., Prager, E.M., Reichlin, M.,
Sercarz, E.E., Smith-Gill, S.J., Todd, P.E. und
Wilson, A.C. (1984)
Ann. Rev. Immunol. 2, 67-101
- (166) Neurath, H. (1980)
in: Protein Folding, ed. Jaenicke, R., Elsevier,
North Holland, Amsterdam, New York, 501-524
- (167) Novotný, J. und Brucoleri, R.E. (1987)
FEBS Lett. 211, 185-189
- (168) Hu, C.-W.C., Griffin, T.A., Lau, K.S., Cox, R.P.
und Chuang, D.T. (1986)
J. Biol. Chem. 261, 343-349
- (169) Chien, S.-M. und Freeman, K.B. (1986)
Biochem. Biophys. Res. Com. 141, 313-318
- (170) Hock, B. (1984)
Physiol. Veg. 22, 333-340
- (171) Osumi, T., Ishii, N., Hijikata, M., Kamijo, K.,
Ozasa, H., Furuta, S., Miyazawa, S., Kondo, K.,
Inoue, K., Kagamiyama, H. und Hashimoto, T. (1985)
J. Biol. Chem. 260, 8905-8910
- (172) Miura, S., Mori, M., Takiguchi, M., Furuta, S.,
Miyazawa, S. und Hashimoto, T. (1984)
J. Biol. Chem. 259, 6397-6402
- (173) Kindl, H. (1982)
Ann. N.Y. Acad. Sci. 386, 314-328
- (174) Fujiki, Y., Rachubinski, R.A., Zentella-Dehesa, A.
und Lazarow, P.B. (1986)
J. Biol. Chem. 261, 15787-15793
- (175) Furuta, S., Hashimoto, T., Miura, S., Mori, M.
und Tatibana, M. (1982)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 105, 639-646
- (176) Behrends, W. (1987)
Dissertation, Philipps-Universität Marburg/Lahn
- (177) Ozasa, F., Furuta, S., Miyazawa, S., Osumi, T.,
Hashimoto, T., Mori, M., Miura, S. und Tatibana, M.
(1984)
Eur. J. Biochem. 144, 453-458

- (178) Ikeda, Y., Fenton, W.A. und Tanaka, K. (1984)
Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 43, 2024
- (179) Mori, H., Matsue, H., Miura, S., Tatibana, M. und
Hashimoto, T. (1985)
Eur. J. Biochem. 149, 181-186
- (180) Schatz, G. und Butow, R.A. (1983)
Cell 32, 316-318
- (181) Hay, R., Böhni, P. und Grassler, S. (1984)
Biochim. Biophys. Acta 779, 65-87
- (182) Douglas, M.G., McCammon, M.T. und Vassarotti, A. (1986)
Microbiol. Rev., 166-178
- (183) Borst, P. (1986)
Biochim. Biophys. Acta 866, 179-203
- (184) Fujiki, Y., Rachubinski, R.A. und Lazarow, P.B. (1984)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 7127-7131
- (185) Trelease, R.N. (1984)
Ann. Rev. Plant Physiol. 35, 321-347
- (186) Kindl, H. (1982)
Int. Rev. Cytol. 80, 193-229
- (187) Yamaguchi, J., Nishimura, M. und Akazawa, T. (1984)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 4809-4813
- (188) Gietl, C. und Hock, B. (1984)
Planta 162, 261-267
- (189) Lazarow, P.B., Small, G.M., Imanaka, T., Shio, H.,
Alexson, S., Mortensen, R.M., Rachubinski, R.A. und
Fujiki, Y. (1987)
in: Peroxisomes in Biology and Medicine, ed. H.D. Fahimi,
H. Sies, 394-401
- (190) Douma, A.C., Veenhuis, M., Sulter, G.J. und Harder, W.
(1986)
Eur. J. Cell Biol. 41, Suppl. 14, 12
- (191) Nguyen, T., Zelechowska, M., Foster, V., Bergmann, H.
und Verma, D.P.S. (1985)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5040-5044
- (192) Okazaki, K., Takechi, T., Kambara, N., Fukui, S.,
Kubota, I. und Kamiryo, T. (1986)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 1232-1236

- (193) Swinkels, B.W., Gibson, W.C., Osinga, K.A., Kramer, R., Veeneman, G.H., van Boom, J.H. und Borst, P. (1986)
EMBO J. 5, 1291-1298
- (194) Lazarow, P.B. und Fujiki, Y. (1985)
Ann. Rev. Cell Biol. 1, 489-530
- (195) Veenhuis, M., Van Dijken, J.P., Pilson, S.A.F. und Harder (1978)
Arch. Microbiol. 117, 153-163
- (196) Schutgens, R.B.H., Heymans, H.S.A., Wanders, R.J.A., van den Bosch, H. und Tager, J.M. (1986)
Eur. J. Pediatr. 144, 430-440
- (197) Goldfischer, S., Moore, C.L., Johnson, A.B., Spiro, A.J., Valsamis, M.P., Wisniewski, H.K., Ritch, R.H., Norron, W.T., Rapin, I. und Garnier, L.M. (1973)
Science 182, 62-64

Für das Zustandekommen der vorliegenden Arbeit bin ich zu besonderem Dank verpflichtet:

Herrn Prof. Dr. W.-H. Kunau für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, seine ständige Diskussionsbereitschaft und ausgezeichnete Betreuung während der Anfertigung dieser Arbeit,

Herrn Prof. Dr. W. Hengstenberg für die Übernahme des Korreferates,

Herrn Dr. H. Meyer für die Durchführung der aminoterminalen Sequenzanalysen und HPLC-Trennungen,

Herrn Dr. M. Veenhuis, Universität Groningen, Niederlande, für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen,

Herrn Dr. W. Behrends, Philipps-Universität Marburg, für die Überlassung von Antiserum gegen das multifunktionelle β -Oxidationsenzym aus *Cucumis sativus*,

Frau M. Moreno de la Garza für die Gabe von Antiserum gegen Trifunktionelles Enzym aus *Candida tropicalis*,

Frau A. Ledebur für die Überlassung von Antiserum gegen Katalase aus *Neurospora crassa*,

Frau U. Dorpmund für die Präparation von Acyl-CoA Estern,

Frau E. Pfitzner, Frau A. Fink, Herrn E. Schönbrunn, Herrn H. Bückner und Herrn W. Schliebs für die gute Zusammenarbeit bei der limitierten Proteolyse bzw. den Organellenpräparationen,

Frau B. Burmann für die Präparation von bromcyangespaltenem Myoglobin,

allen Mitarbeitern des Instituts für Physiologische Chemie, insbesondere den Mitarbeitern der Abteilung für Zellbiochemie für freundliche Unterstützung und hilfreiche Diskussionen.

L E B E N S L A U F

Rolf Thieringer

- | | |
|------------------------|--|
| 25. Februar 1959 | Geboren als zweiter Sohn der Eheleute Hugo und Hermine Thieringer geb. Schmedes in Recklinghausen |
| 1965 - 1968 | Besuch der Weilenbrink-Grundschule in Bochum |
| 1968 - 1977 | Besuch des Goethe-Gymnasiums in Bochum |
| Juni 1977 | Abitur |
| Juli 1977 - März 1978 | Grundwehrdienst bei der Bundeswehr |
| April 1978 - März 1982 | Studium der Pharmazie an der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster |
| September 1980 | Bestehen des Ersten Abschnitts der Pharmazeutischen Prüfung |
| April 1982 | Bestehen des Zweiten Abschnitts der Pharmazeutischen Prüfung |
| Juni 1982 - Mai 1983 | Praktisches Jahr in der Apotheke Dr. Prinzenberg in Bochum |
| Mai 1983 | Bestehen des Dritten Abschnitts der Pharmazeutischen Prüfung |
| Juni 1983 | Approbation als Apotheker |
| Juli 1983 - April 1987 | Anfertigung der vorliegenden Doktorarbeit bei Prof. W.-H. Kunau am Institut für Physiologische Chemie der Ruhr-Universität Bochum. |

